

04.10.2004

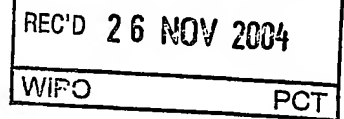
日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 3 年 9 月 3 0 日

出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 3 4 2 5 8 8  
[ST. 10/C]: [ J P 2 0 0 3 - 3 4 2 5 8 8 ]



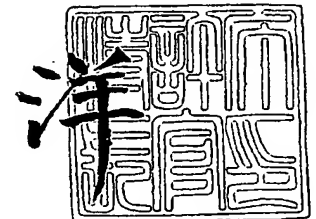
出 願 人  
Applicant(s): 第一製薬株式会社  
セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 1 月 1 1 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 NP03-1160  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 A61P 25/28  
C12N 09/50  
C12Q 01/37

【発明者】  
【住所又は居所】 千葉県千葉市美浜区中瀬 1 丁目 3 番地  
幕張テクノガーデンD棟 1 7 階  
セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社内  
土居 洋文

【氏名】  
【発明者】  
【住所又は居所】 東京都江戸川区北葛西 1 丁目 1 6 番 1 3 号  
第一製薬株式会社 東京研究開発センター内  
斎藤 憲

【氏名】  
【特許出願人】  
【識別番号】 000002831  
【氏名又は名称】 第一製薬株式会社

【特許出願人】  
【識別番号】 500520628  
【氏名又は名称】 セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社

【代理人】  
【識別番号】 100088904  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 庄司 隆  
【電話番号】 03-3864-6572

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 067070  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

SHC3、ATF6およびCREBL1のうちの1つ以上のHtrA2による分解、を阻害することを特徴とする神経細胞死阻害方法。

**【請求項 2】**

SHC3、ATF6またはCREBL1のHtrA2による分解、を阻害する化合物を少なくとも1つ以上用いることを特徴とする神経細胞死阻害方法。

**【請求項 3】**

神経細胞死が脳虚血による神経細胞死である請求項1または2に記載の神経細胞死阻害方法。

**【請求項 4】**

SHC3、ATF6およびCREBL1のうちの1つ以上のHtrA2による分解、を阻害することを特徴とする脳虚血障害または神経変性疾患の防止方法、治療方法または改善方法。

**【請求項 5】**

神経変性疾患がアルツハイマー病、パーキンソン病、ポリグルタミン病、プリオン病または筋萎縮性側索硬化症である請求項4に記載の防止方法、治療方法または改善方法。

**【請求項 6】**

SHC3、ATF6またはCREBL1のHtrA2による分解、を阻害する化合物の同定方法であって、SHC3、ATF6またはCREBL1のHtrA2による分解、を可能にする条件下、SHC3、ATF6またはCREBL1とHtrA2とを化合物と接触させ、SHC3、ATF6またはCREBL1を検出することができるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用いて、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在および／または変化を検出することにより、化合物がSHC3、ATF6またはCREBL1の分解を阻害するか否かを決定する方法。

**【請求項 7】**

SHC3、ATF6またはCREBL1のHtrA2による分解、を阻害する化合物の同定方法であって、SHC3、ATF6またはCREBL1のHtrA2による分解、を可能にする条件下、SHC3、ATF6またはCREBL1とHtrA2とを化合物と接触させ、SHC3、ATF6またはCREBL1の存在若しくは不存在の検出および／またはその量の変化の測定により、あるいはSHC3の分解物、ATF6の分解物またはCREBL1の分解物の存在若しくは不存在の検出および／またはその量の変化の測定により、化合物がSHC3、ATF6またはCREBL1の分解を阻害するか否かを決定する方法。

**【請求項 8】**

SHC3、ATF6またはCREBL1のHtrA2による分解、を阻害する化合物を少なくとも1つ以上含んでなる神経細胞死阻害剤。

**【請求項 9】**

神経細胞死が脳虚血による神経細胞死である請求項8に記載の神経細胞死阻害剤。

**【請求項 10】**

SHC3、ATF6またはCREBL1のHtrA2による分解、を阻害する化合物を少なくとも1つ以上含んでなる脳虚血障害または神経変性疾患の防止剤、治療剤または改善剤。

**【請求項 11】**

神経変性疾患がアルツハイマー病、パーキンソン病、ポリグルタミン病、プリオン病または筋萎縮性側索硬化症である請求項10に記載の神経変性疾患の防止剤、治療剤または改善剤。

**【請求項 12】**

HtrA2、HtrA2をコードするポリヌクレオチドおよびHtrA2をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいずれか1つと、SHC3、AT

F6、CREBL1、並びにSHC3、ATF6およびCREBL1のいずれか1つをコードするポリヌクレオチド、並びにSHC3、ATF6およびCREBL1のいずれか1つをコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいずれか1つと含んでなる試薬キット。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】SHC3、ATF6またはCREBL1のHtrA2による分解を阻害することによる神経細胞死阻害および神経変性疾患の改善方法

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、SHC3、ATF6およびCREBL1のうちの少なくとも1つのHtrA2による分解、の阻害に関する。より具体的には、SHC3、ATF6およびCREBL1のうちの1つ以上のHtrA2による分解、を阻害することを特徴とする神経細胞死阻害方法、あるいは該分解を阻害する化合物を少なくとも1つ以上用いることを特徴とする神経細胞死阻害方法に関する。また、SHC3、ATF6およびCREBL1のうちの1つ以上のHtrA2による分解、を阻害することを特徴とする脳虚血障害または神経変性疾患の防止方法、治療方法または改善方法に関する。さらに、SHC3、ATF6またはCREBL1のHtrA2による分解、を阻害する化合物の同定方法に関する。また、SHC3、ATF6またはCREBL1のHtrA2による分解、を阻害する化合物を少なくとも1つ以上含んでなる神経細胞死阻害剤に関する。さらに、SHC3、ATF6またはCREBL1のHtrA2による分解、を阻害する化合物を少なくとも1つ以上含んでなる脳虚血障害または神経変性疾患の防止剤、治療剤または改善剤に関する。また、HtrA2、HtrA2をコードするポリヌクレオチドおよびHtrA2をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいずれか1つと、SHC3、ATF6、CREBL1、並びにSHC3、ATF6およびCREBL1のいずれか1つをコードするポリヌクレオチド、並びにSHC3、ATF6およびCREBL1のいずれか1つをコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいずれか1つとを含んでなる試薬キットに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

生物は、細胞の生存とアポトーシス（細胞死）を調節することで外界のストレスから身を守るが、生存とアポトーシス制御機構の調節の乱れによる過剰な細胞死は、種々の疾患を招く可能性がある（非特許文献1）。

## 【0003】

近年、ストレスを感知し調節する場としてミトコンドリアや小胞体の研究が進み、ミトコンドリア膜に局在するHtrA2蛋白質（以下、HtrA2と称する）は、UVや熱ショック等のストレスによりミトコンドリア膜から細胞質へ移行し（非特許文献2、4、5および6）、カスパーゼ依存的な細胞死とカスパーゼ非依存的な細胞死の二つの細胞死誘導を行うことが報告された（非特許文献3）。HtrA2は、前駆体蛋白質（配列番号2）からN末133アミノ酸が切り離された成熟型（配列番号4）になり、ミトコンドリアから細胞質に移行する。

## 【0004】

カスパーゼ非依存的な細胞死は、HtrA2自身のセリンプロテアーゼとしての性質に依存し、その前駆体蛋白質のアミノ酸配列中306番目（成熟型においては174番目に相当する）のセリンをアラニンに置換した変異体〔以下、HtrA2（S306A）と称する。〕ではカスパーゼ非依存的な細胞死は引き起こされないことが知られている（非特許文献4-6）。このようにHtrA2は、カスパーゼ非依存的な細胞死を誘導する機構において重要な役割を担う因子である。

## 【0005】

以下に本明細書において引用した文献を列記する。

【非特許文献1】「細胞工学」、2002年、第21巻、第4号、p. 360-394。

【非特許文献2】ヤマグチ（H. Yamaguchiら、「キャンサーリサーチ（Cancer Research）」、2003年、第63巻、p. 1483-1489。

【非特許文献3】「実験医学」、2002年、第20巻、第1号、p. 73-75。

【非特許文献4】スズキ (Y. Suzuki) ら、「モレキュラー セル (Molecular Cell)」、2001年、第8巻、p. 613-621。

【非特許文献5】ヘッジ (R. Hegde) ら、「ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)」、2002年、第277巻、p. 432-438。

【非特許文献6】マーチンズ (L. M. Martins) ら、「ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)」、2002年、第277巻、p. 439-444。

【非特許文献7】コンティ (L. Conti) ら、「ネイチャー ニューロサイエンス (Nature Neuroscience)」、2001年、第4巻、p. 579-586。

【非特許文献8】「生化学」、2001年、第73巻、第11号、p. 1322-1325。

【非特許文献9】カウフマン (R. J. Kaufman) ら、「ジャーナル クリニカル インベスティゲーション (Journal of Clinical Investigation)」、2002年、第110巻、p. 1389-1398。

【非特許文献10】ハゼ (K. Haze) ら、「バイオケミカル ジャーナル (Biochemical Journal)」、2001年、第355巻、p. 19-28。

【非特許文献11】ウルマー (K. M. Ulmer)、「サイエンス (Science)」、1983年、第219巻、p. 666-671。

【非特許文献12】「ペプチド合成」、丸善株式会社、1975年。

【非特許文献13】「ペプチド シンテシス (Peptide Synthesis)」、インターサイエンス (Interscience)、ニューヨーク (New York)、1996年。

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

##### 【0006】

これまでに神経変性疾患におけるカスパーゼ非依存的な細胞死についての報告が、多数見出されている。一方、脳虚血においては、小胞体ストレスを介して神経細胞死が引き起こされる。このことからHtrA2が、神経変性疾患の新たな標的となる可能性が高く、また小胞体ストレスによる神経細胞死を調節することは、新規な創薬標的になると考えられる。

##### 【0007】

本発明の課題は、HtrA2によるカスパーゼ非依存的な細胞死の機構およびHtrA2の基質が未だ明らかになっていない状況において、HtrA2と相互作用する蛋白質を見出し、該蛋白質のHtrA2による分解、に基づく疾患の防止および/または治療を可能にする手段を提供することである。

#### 【課題を解決するための手段】

##### 【0008】

上記課題を解決すべく本発明者らは鋭意努力し、HtrA2がCREBL1またはSHC1と相互作用することをインシリコ (in silico) で予測し、さらに活性型HtrA2 (成熟型HtrA2) によりCREBL1、CREBL1のファミリーであるATF6およびSHC1のファミリーであるSHC3が分解されることを実験的に証明して本発明を完成した。

##### 【0009】

すなわち、本発明は、

1. SHC3、ATF6およびCREBL1のうちの1つ以上のHtrA2による分解、を阻害することを特徴とする神経細胞死阻害方法、

2. SHC3、ATF6またはCREBL1のHtrA2による分解、を阻害する化合物を少なくとも1つ以上用いることを特徴とする神経細胞死阻害方法、

3. 神経細胞死が脳虚血による神経細胞死である前記1. または2. の神経細胞死阻害方法、

4. SHC3、ATF6およびCREBL1のうちの1つ以上のHtrA2による分解、を阻害することを特徴とする脳虚血障害または神経変性疾患の防止方法、治療方法または改善方法、

5. 神経変性疾患がアルツハイマー病、パーキンソン病、ポリグルタミン病、プリオン病または筋萎縮性側索硬化症である前記4. の防止方法、治療方法または改善方法、

6. SHC3、ATF6またはCREBL1のHtrA2による分解、を阻害する化合物の同定方法であって、SHC3、ATF6またはCREBL1のHtrA2による分解、を可能にする条件下、SHC3、ATF6またはCREBL1とHtrA2とを化合物と接触させ、SHC3、ATF6またはCREBL1を検出することができるシグナルおよび/またはマーカーを使用する系を用いて、このシグナルおよび/またはマーカーの存在若しくは不存在および/または変化を検出することにより、化合物がSHC3、ATF6またはCREBL1の分解を阻害するか否かを決定する方法、

7. SHC3、ATF6またはCREBL1のHtrA2による分解、を阻害する化合物の同定方法であって、SHC3、ATF6またはCREBL1のHtrA2による分解、を可能にする条件下、SHC3、ATF6またはCREBL1とHtrA2とを化合物と接触させ、SHC3、ATF6またはCREBL1の存在若しくは不存在の検出および/またはその量の変化の測定により、あるいはSHC3の分解物、ATF6の分解物またはCREBL1の分解物の存在若しくは不存在の検出および/またはその量の変化の測定により、化合物がSHC3、ATF6またはCREBL1の分解を阻害するか否かを決定する方法、

8. SHC3、ATF6またはCREBL1のHtrA2による分解、を阻害する化合物を少なくとも1つ以上含んでなる神経細胞死阻害剤、

9. 神経細胞死が脳虚血による神経細胞死である前記8. の神経細胞死阻害剤、

10. SHC3、ATF6またはCREBL1のHtrA2による分解、を阻害する化合物を少なくとも1つ以上含んでなる脳虚血障害または神経変性疾患の防止剤、治療剤または改善剤、

11. 神経変性疾患がアルツハイマー病、パーキンソン病、ポリグルタミン病、プリオン病または筋萎縮性側索硬化症である前記10. の神経変性疾患の防止剤、治療剤または改善剤、

12. HtrA2、HtrA2をコードするポリヌクレオチドおよびHtrA2をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいずれか1つと、SHC3、ATF6、CREBL1、並びにSHC3、ATF6およびCREBL1のいずれか1つをコードするポリヌクレオチド、並びにSHC3、ATF6およびCREBL1のいずれか1つをコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいずれか1つとを含んでなる試薬キット、に関する。

#### 【発明の効果】

#### 【0010】

本発明ではHtrA2と相互作用するCREBL1およびSHC1を見出し、さらに活性型HtrA2がCREBL1、CREBL1のファミリーであるATF6およびSHC1のファミリーであるSHC3を分解することを初めて明らかにした。ATF6およびCREBL1は、小胞体ストレスを感知してシャペロン遺伝子群の転写を誘導し、細胞における小胞体ストレスの回復とその生存に関与すると考えられる。SHC3は成熟した中枢神経細胞に特異的に発現し、神経細胞の分化と生存に重要な役割を果たしていると考えられる。これらから、本発明は、SHC3、ATF6またはCREBL1のHtrA2による分解、に基づく神経細胞死の阻害、並びに神経細胞死に基づく疾患、例えば神経変性疾

患の防止、治療または改善のために非常に有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

以下、本発明について発明の実施の態様をさらに詳しく説明する。以下の詳細な説明は例示であり、説明のためのものに過ぎず、本発明を何ら限定するものではない。

本明細書においては単離された若しくは合成の完全長蛋白質；単離された若しくは合成の完全長ポリペプチド；または単離された若しくは合成の完全長オリゴペプチドを意味する総称的用語として「ポリペプチド」という用語を使用することがある。ここで蛋白質、ポリペプチド若しくはオリゴペプチドはペプチド結合または修飾されたペプチド結合により互いに結合している2個以上のアミノ酸を含むものである。以降、アミノ酸を表記する場合、1文字または3文字にて表記することがある。

【0012】

本発明においては、H t r A 2とCREBL1またはSHC1が相互作用することを、国際公開WO01/67299号パンフレット記載の方法に従ってインシリコで予測した。さらに実験的に、H t r A 2がCREBL1、CREBL1のファミリーであるATF6およびSHC1のファミリーであるSHC3を分解することを初めて明らかにした。

【0013】

H t r A 2、SHC3、ATF6およびCREBL1はいずれも公知蛋白質であり、ジェンバンク (GenBank) にそれぞれアクセッション番号NM\_013247、NM\_016848、NM\_007348およびNM\_00438として開示されている。本実施例においては、H t r A 2として配列番号4に記載のアミノ酸配列からなる成熟型H t r A 2を、並びにSHC3として配列番号16、ATF6として配列番号20およびCREBL1として配列番号18にそれぞれ記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを用いた。本実施例で用いたSHC3 (p64) DNA (配列番号15) は、アクセッション番号NM\_016848に開示された塩基配列と比較して6つの塩基に相違が認められた (実施例2参照)。本実施例で用いたATF6 DNA (配列番号19) は、アクセッション番号NM\_007348に開示された塩基配列と比較して15個の塩基に相違が認められた (実施例2参照)。本実施例で用いたCREBL1 DNA (配列番号17) は、アクセッション番号NM\_00438に開示された塩基配列と比較して塩基の1つに相違が認められた (実施例2参照)。

【0014】

SHC3は、N-S h cあるいはS h c Cとも称され、成熟した中枢神経細胞に特異的に発現し、神経栄養因子 (NGFやEGF等) により活性化されたレセプターチロシンキナーゼであるTrkファミリー (Trk family) からのシグナルを伝達し、PI3K-Akt-Bad経路を通じて神経細胞の分化と生存に重要な役割を果たしていると考えられる。またSHC3のSHドメインのみ (dominant negative) を発現させた細胞では、細胞死が引き起こされ、神経突起の伸長が妨げられる (非特許文献7および8)。

【0015】

CREBL1は、ATF6  $\beta$ とも称されるATF6のファミリーであり、小胞体に局在する。CREBL1は小胞体ストレスによりS1P、S2Pによりプロセッシングを受けて一部が核移行し、転写因子として働くことが知られている。

【0016】

CREBL1およびATF6はいずれも、小胞体ストレスを感知してシャペロン遺伝子群の転写を誘導することでストレスに対する細胞の回復と生存に寄与することが知られている (非特許文献9および10)。また、小胞体ストレスと神経変性疾患の関連性はいくつかの論文で報告されている (非特許文献1)。

【0017】

これらから、神経細胞において過剰なストレス (小胞体ストレス) により活性化されたH t r A 2は、SHC3、ATF6およびCREBL1のうちの少なくとも1つを分解す



ることで、神経細胞の分化・生存シグナル経路の破綻を招き、その結果、神経細胞死が亢進されると考える。すなわちSHC3、ATF6およびCREBL1のうちの少なくとも1つのHtrA2による分解、の阻害は神経細胞の生存につながり、該分解の阻害剤は、神経変性疾患や脳虚血障害の治療薬になる可能性が考えられる。したがって、SHC3、ATF6またはCREBL1のうちの少なくとも1つのHtrA2による分解、を阻害することによりこれら蛋白質の少なくとも1つの分解に基づく疾患の防止および／または治療が可能になる。例えば、SHC3、ATF6またはCREBL1のうちの少なくとも1つのHtrA2による分解、を阻害することにより、神経細胞死、例えば小胞体ストレスによる神経細胞死を阻害でき、さらには神経細胞死に基づく疾患の防止、治療または改善が可能になる。

#### 【0018】

これらの知見に基づいて、本発明においては、SHC3、ATF6およびCREBL1のうちの少なくとも1つのHtrA2による分解、の阻害方法を提供する。さらに、SHC3、ATF6およびCREBL1のうちの1つ以上のHtrA2による分解、を阻害することを特徴とする神経細胞死阻害方法並びにこれらの分解に基づく疾患の防止方法、治療方法または改善方法を提供する。

#### 【0019】

SHC3、ATF6およびCREBL1のうちの少なくとも1つのHtrA2による分解、の阻害はHtrA2の作用を阻害することにより実施可能である。例えば、SHC3、ATF6またはCREBL1とHtrA2の相互作用を阻害することにより実施できる。あるいは、HtrA2の酵素活性を阻害することにより実施できる。ここでは、このような阻害効果を有する物質（後述する例として競合阻害効果を有するポリペプチド類、抗体および低分子化合物等が挙げられる。）を阻害剤と称する。また、本明細書中で、「SHC3、ATF6またはCREBL1とHtrA2が相互作用する」とは、SHC3、ATF6またはCREBL1とHtrA2がある様式により互いに作用を及ぼし、その結果、具体的にはSHC3、ATF6またはCREBL1がHtrA2により分解されることを意味する。前記「ある様式」とは、結合、接触あるいは近接等を含むものであり、結果として互いに作用を及ぼし得る様式であればいずれのものであってもよい。

#### 【0020】

SHC3、ATF6およびCREBL1のうちの少なくとも1つのHtrA2による分解、の阻害は具体的には、SHC3、ATF6またはCREBL1とHtrA2の相互作用を阻害する化合物を用いて実施可能である。かかる化合物として、SHC3、ATF6またはCREBL1とHtrA2が相互作用する部位のアミノ酸配列からなるポリペプチドが例示できる。特に、HtrA2の基質となるSHC3、ATF6またはCREBL1由来のかかるポリペプチドは、蛋白質間相互作用を競合的に阻害し、HtrA2によるこれら各蛋白質の分解、を阻害することができる。このようなポリペプチドは、HtrA2、SHC3、ATF6またはCREBL1のアミノ酸配列から設計し、自体公知のペプチド合成法により合成したものから、SHC3、ATF6またはCREBL1のHtrA2による分解、を阻害するものを選択することにより得ることができる。SHC3、ATF6またはCREBL1のHtrA2により分解される部位のアミノ酸配列からなるポリペプチドは、かかるポリペプチドとして好適である。このように特定されたポリペプチドに、1個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入等の変異を導入したものも本発明の範囲に包含される。このような変異を導入したポリペプチドは、さらにSHC3、ATF6またはCREBL1のHtrA2による分解、を阻害するものが好ましい。変異を有するポリペプチドは天然に存在するものであってもよく、また変異を導入したものであってもよい。欠失、置換、付加または挿入等の変異を導入する手段は自体公知であり、例えばウルマー（Ulmer）の技術（非特許文献11）を利用できる。このような変異の導入において、当該ポリペプチドの基本的な性質（物性、機能または免疫学的活性等）を変化させないという観点から、例えば、同族アミノ酸（極性アミノ酸、非極性アミノ酸、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸、陽性荷電アミノ酸、陰性荷電アミノ酸および芳香族アミ

ノ酸等)の間での相互置換は容易に想定される。さらに、これら利用できるポリペプチドは、その構成アミノ基またはカルボキシル基等を、例えばアミド化修飾する等、機能の著しい変更を伴わない程度に改変が可能である。

#### 【0021】

上記ポリペプチドは、ペプチド化学において知られる一般的な方法で製造できる。例えば、成書(非特許文献12および13)に記載の方法が例示されるが、これらに限らず公知の方法が広く利用可能である。具体的には、通常の液相法および固相法によるペプチド合成法、例えばFmoc法等を挙げることができる。または市販のアミノ酸合成装置を用いて製造可能である。あるいは遺伝子工学的手法により取得することもできる。例えば目的とするポリペプチドをコードする遺伝子を宿主細胞中で発現できる組換えDNA(発現ベクター)を作成し、これを適当な宿主細胞、例えば大腸菌にトランスフェクションして形質転換した後に該形質転換体を培養し、次いで得られる培養物から目的とするポリペプチドを回収することにより製造可能である。

#### 【0022】

SHC3、ATF6またはCREBL1のHtrA2による分解、の阻害は、HtrA2、SHC3、ATF6またはCREBL1を認識する抗体であって、SHC3、ATF6またはCREBL1のHtrA2による分解、を阻害する抗体を用いることによって実施可能である。かかる抗体は、HtrA2、SHC3、ATF6またはCREBL1自体、あるいはSHC3、ATF6またはCREBL1とHtrA2が相互作用する部位のアミノ酸配列からなるポリペプチドを抗原として自体公知の抗体作製法により得ることができる。

#### 【0023】

SHC3、ATF6またはCREBL1のHtrA2による分解、の阻害は、HtrA2の酵素活性を阻害する化合物、好ましくは特異的に阻害する化合物により実施可能である。かかる化合物は、例えば、SHC3、ATF6またはCREBL1を基質として、HtrA2による当該基質の分解、を阻害するものを同定することにより得ることができる。HtrA2を特異的に阻害するとは、HtrA2を強く阻害するが、他の酵素は阻害しないか、弱く阻害することを意味する。

#### 【0024】

SHC3、ATF6またはCREBL1のHtrA2による分解、を阻害する化合物の同定方法は、自体公知の医薬品スクリーニングシステムを利用して構築可能である。例えば、SHC3、ATF6またはCREBL1のHtrA2による分解、を可能にする条件を選択し、当該条件下でSHC3、ATF6若しくはCREBL1および/またはHtrA2を、調べようとする化合物(被検化合物)と接触させ、SHC3、ATF6またはCREBL1分解を検出することができるシグナルおよび/またはマーカーを使用する系を用いて、このシグナルおよび/またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、SHC3、ATF6またはCREBL1のHtrA2による分解、を阻害する化合物を同定できる。SHC3、ATF6またはCREBL1のHtrA2による分解、を可能にする条件は、インビトロのものであってもよく、インビボのものであってもよい。例えば、SHC3、ATF6またはCREBL1とHtrA2とを共発現させた細胞を用いることもできる。細胞における共発現は、SHC3、ATF6、CREBL1をそれぞれコードするポリヌクレオチドを含む適当なベクターとHtrA2をコードするポリヌクレオチドを含む適当なベクターとを用いて慣用の遺伝子工学的方法でこれらを細胞にトランスフェクションすることにより達成できる。SHC3、ATF6若しくはCREBL1および/またはHtrA2と被検化合物との接触は、SHC3、ATF6またはCREBL1のHtrA2による分解、の反応以前に行なってもよいし、該分解の反応に共存させることにより行なってもよい。ここでシグナルとは、そのもの自体がその物理的または化学的性質により直接検出され得るものを指し、マーカーとはそのものの物理的または生物学的性質を指標として間接的に検出され得るものを指す。シグナルとしてはルシフェラーゼ、グリーン蛍光蛋白質、および放射性同位体等、マーカーとしては、レポーター遺

伝子、例えばクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子等、または検出用のエピトープタグ、例えば6×His-tag等、公知のものが利用できる。これらシグナルまたはマーカーの検出方法は当業者には周知のものである。簡便には、SHC3、ATF6またはCREBL1の分解は、これら蛋白質またはこれら蛋白質の分解物の存在若しくは不存在の検出および/またはその量の変化の測定により判定可能である。これら蛋白質量またはこれら蛋白質の分解物量の定量は、自体公知の蛋白質またはペプチドの検出方法、例えばウェスタンブロッティング法等を用いて実施できる。

#### 【0025】

本発明において使用するHtrA2、SHC3、ATF6およびCREBL1は、これらを遺伝子工学的手法で発現させた細胞、無細胞系合成産物、化学合成産物、または該細胞や生体試料から調製したものであってよく、これらからさらに精製されたものであってもよい。また、SHC3、ATF6またはCREBL1とHtrA2の相互作用、およびこれら蛋白質の機能、例えばHtrA2の蛋白質分解酵素活性やSHC3、ATF6またはCREBL1の酵素基質としての性質等に影響がなければ、N末端側やC末端側に別の蛋白質やポリペプチド、例えばβ-ガラクトシダーゼ、IgG等の免疫グロブリンFc断片、His-tag、Myc-tag、HA-tag、FLAG-tag、またはXpress-tag等のtagペプチド類を、直接的にまたはリンカーペプチド等を介して間接的に、遺伝子工学的手法等を用いて付加したものであってもよい。

#### 【0026】

被検化合物としては、例えば化学ライブラリーや天然物由来の化合物、またはHtrA2、SHC3、ATF6またはCREBL1の一次構造や立体構造に基づいてドラッグデザインして得られた化合物等が挙げられる。あるいは、SHC3、ATF6またはCREBL1のHtrA2により分解される部位のアミノ酸配列からなるポリペプチドの構造に基づいてドラッグデザインして得られた化合物等も被検化合物として好適である。

#### 【0027】

上記同定方法で得られた化合物は、SHC3、ATF6またはCREBL1のHtrA2による分解、の阻害剤として利用可能である。当該化合物は、生物学的有用性と毒性のバランスを考慮して選別することにより、医薬組成物として調製可能である。医薬組成物の調製において、これら化合物は、単独で使用することもできるし、複数を組み合わせて使用することも可能である。

#### 【0028】

上記化合物は、SHC3、ATF6またはCREBL1のHtrA2による分解、に基づく神経細胞死の阻害剤に利用可能である。好ましくは小胞体ストレスによる神経細胞死の阻害剤として有用である。より好ましくは脳虚血による神経細胞死の阻害剤に利用できる。

#### 【0029】

上記化合物はさらに、SHC3、ATF6またはCREBL1のHtrA2による分解、に基づく疾患の防止剤、治療剤または改善剤、並びに当該疾患の防止方法、治療方法または改善方法に利用可能である。かかる疾患としては、例えば神経細胞死に基づく疾患、より具体的にはアルツハイマー病、パーキンソン病、ポリグルタミン病、プリオン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)等を挙げることができる。これら疾患は多くの場合、神経細胞内に異常な蛋白質が凝集体を形成していることが認められており、またこれら疾患における神経細胞死と小胞体ストレスとの関連が報告されている(非特許文献1)。

#### 【0030】

本発明に係る疾患の防止剤、治療剤または改善剤は、上記化合物および上記神経細胞死阻害剤のうち少なくともいずれか1つを有効成分としてその有効量含む医薬となしてもよいが、通常は、1種または2種以上の医薬用担体を用いて医薬組成物として製造することが好ましい。

#### 【0031】

本発明に係る医薬製剤中に含まれる有効成分の量は、広範囲から適宜選択されるが、通

常約 0.00001~70 重量%、好ましくは 0.0001~5 重量%程度の範囲とするのが適当である。

#### 【0032】

医薬用担体としては、製剤の使用形態に応じて通常使用される、充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤等の希釈剤や賦形剤等を例示でき、これらは得られる製剤の投与形態に応じて適宜選択使用される。

#### 【0033】

例えば水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトース等が挙げられる。これらは、本発明に係る剤形に応じて適宜 1 種類または 2 種類以上を組合せて使用される。

#### 【0034】

所望により、通常の蛋白質製剤に使用され得る各種の成分、例えば安定化剤、殺菌剤、緩衝剤、等張化剤、キレート剤、pH 調整剤、界面活性剤等を適宜使用して調製することもできる。

#### 【0035】

安定化剤としては、例えばヒト血清アルブミンや通常の L-アミノ酸、糖類、セルロース誘導体等を例示でき、これらは単独でまたは界面活性剤等と組合せて使用できる。特にこの組合せによれば、有効成分の安定性をより向上させ得る場合がある。上記 L-アミノ酸は、特に限定はなく、例えばグリシン、システイン、グルタミン酸等のいずれでもよい。糖類も特に限定はなく、例えばグルコース、マンノース、ガラクトース、果糖等の単糖類、マンニトール、イノシトール、キシリトール等の糖アルコール、ショ糖、マルトース、乳糖等の二糖類、デキストラン、ヒドロキシプロピルスターチ、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸等の多糖類等およびそれらの誘導体等のいずれでもよい。セルロース誘導体も特に限定はなく、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム等のいずれでもよい。界面活性剤も特に限定はなく、イオン性および非イオン性界面活性剤のいずれも使用できる。これには、例えばポリオキシエチレングリコールソルビタンアルキルエステル系、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系、ソルビタンモノアルキルエステル系、脂肪酸グリセリド系等が包含される。

#### 【0036】

緩衝剤としては、ホウ酸、リン酸、酢酸、クエン酸、ε-アミノカプロン酸、グルタミン酸および/またはそれらに対応する塩（例えばそれらのナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ金属塩やアルカリ土類金属塩）等を例示できる。

#### 【0037】

等張化剤としては、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、糖類、グリセリン等を例示できる。

#### 【0038】

キレート剤としては、例えばエデト酸ナトリウム、クエン酸等を例示できる。

#### 【0039】

本発明に係る医薬および医薬組成物は、溶液製剤として使用できる他に、これを凍結乾燥化し保存し得る状態にした後、用時、水や生理的食塩水等を含む緩衝液等で溶解して適当な濃度に調製した後に使用することも可能である。

#### 【0040】

医薬組成物の用量範囲は特に限定されず、含有される成分の有効性、投与形態、投与経路、疾患の種類、対象の性質（体重、年齢、病状および他の医薬の使用の有無等）、およ

び担当医師の判断等に応じて適宜選択される。一般的には適当な用量は、例えば対象の体重 1 kg あたり約 0.01  $\mu$ g 乃至 100 mg 程度、好ましくは約 0.1  $\mu$ g ~ 1 mg 程度の範囲であることが好ましい。しかしながら、当該分野においてよく知られた最適化のための一般的な常套の実験を用いてこれらの用量の変更を行うことができる。上記投与量は 1 日 1 ~ 数回に分けて投与することができ、数日または数週間に 1 回の割合で間欠的に投与してもよい。

#### 【0041】

本発明の医薬組成物を投与するときには、該医薬組成物を単独で使用してもよく、あるいは目的の疾患の防止、治療または改善に必要な他の化合物または医薬と共に使用してもよい。

#### 【0042】

投与経路は、全身投与または局所投与のいずれも選択することができる。この場合、疾患、症状等に応じた適当な投与経路を選択する。例えば、非経口経路として、通常の静脈内投与、動脈内投与のほか、皮下、皮内、筋肉内等への投与を挙げることができる。あるいは経口による投与も可能である。さらに、経粘膜投与または経皮投与も可能である。

#### 【0043】

投与形態としては、各種の形態が目的に応じて選択でき、その代表的なものとしては、錠剤、丸剤、散剤、粉末剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤等の固体投与形態や、水溶液製剤、エタノール溶液製剤、懸濁剤、脂肪乳剤、リポソーム製剤、シクロデキストリン等の包接体、シロップ、エリキシル等の液剤投与形態が含まれる。これらは更に投与経路に応じて経口剤、非経口剤（点滴剤、注射剤）、経鼻剤、吸入剤、経膈剤、坐剤、舌下剤、点眼剤、点耳剤、軟膏剤、クリーム剤、経皮吸収剤、経粘膜吸収剤等に分類され、それぞれ通常の方法に従い、調合、成形、調製することができる。

#### 【0044】

さらに本発明は、H t r A 2、H t r A 2 をコードするポリヌクレオチドおよび H t r A 2 をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいずれか 1 つと、S H C 3、A T F 6 または C R E B L 1、並びに S H C 3、A T F 6 または C R E B L 1 のそれぞれをコードするポリヌクレオチドおよび S H C 3、A T F 6 または C R E B L 1 のそれぞれをコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいずれか 1 つとを含んでなるキットを提供する。当該キットは、例えば本発明に係る同定方法に使用できる。

#### 【0045】

H t r A 2、S H C 3、A T F 6 または C R E B L 1 をコードするポリヌクレオチドは、ヒト c D N A ライブラリーから自体公知の遺伝子工学的的手法により調製することができる。H t r A 2、S H C 3、A T F 6 または C R E B L 1 をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターは、当該ポリヌクレオチドを適当な発現 D N A ベクター、例えば細菌プラスミド由来のベクターに自体公知の遺伝子工学的的手法で導入することにより得られる。

#### 【0046】

上記キットは、S H C 3、A T F 6 または C R E B L 1 の H t r A 2 による分解、を検出するためのシグナルおよび／またはマーカー、緩衝液、並びに塩等、必要とされる物質を含むことができる。さらに、安定化剤および／または防腐剤等の物質を含んでいてもよい。製剤化にあたっては、使用する各物質それぞれに応じた製剤化手段を導入すればよい。

#### 【0047】

以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

#### 【実施例 1】

#### 【0048】

(H t r A 2 と相互作用する機能を有する蛋白質のインシリコでの探索)

H t r A 2と相互作用する機能を有する蛋白質を、国際公開第W O 0 1 / 6 7 2 9 9号パンフレットに記載の予測方法に従って予測した。すなわち、H t r A 2のアミノ酸配列をある長さのオリゴペプチドに分解し、各オリゴペプチドのアミノ酸配列あるいはそのアミノ酸配列と相同なアミノ酸配列を持った蛋白質をデータベース中で検索し、得られた蛋白質とH t r A 2との間でローカルアライメントを行い、ローカルアライメントのスコアの高いものをH t r A 2と相互作用すると予測した。

解析の結果、H t r A 2と相互作用する機能を有すると予測される蛋白質として、C R E B L 1およびS H C 1を見出した。

#### 【実施例2】

##### 【0049】

(インビトロ プロテアーゼアッセイ)

C R E B L 1、C R E B L 1のファミリーであるA T F 6、またはS H C 1のファミリーであるS H C 3とH t r A 2の相互作用を実験的に確認するために、インビトロにおけるプロテアーゼアッセイを実施した。

##### 【0050】

<材料およびその調製>

本実施例においては、活性型H t r A 2および不活性型H t r A 2としてそれぞれ、いずれもC末T a gとしてヒスチジン (H i s) を付加した成熟型H t r A 2 (配列番号4) および成熟型H t r A 2 (S 3 0 6 A) (配列番号6)を用いた。また、H t r A 2と相互作用すると予想した蛋白質として、いずれもC末T a gとしてc-M y cを付加したS H C 3 (p 6 4) (配列番号16) およびS H C 3 (p 5 2)、並びにいずれもN末T a gとしてc-M y cを付加したC R E B L 1 (配列番号18) およびA T F 6 (配列番号20)を用いた。

##### 【0051】

1. 成熟型H t r A 2および成熟型H t r A 2 (S 3 0 6 A) のクローニングおよび発現プラスミドの作製

成熟型H t r A 2 [前駆体H t r A 2 (DNA塩基配列および該DNAがコードするアミノ酸配列は配列番号1および2に記載) のアミノ酸残基134-458部分] の遺伝子を得るために、Human Kidney QUICK-Clone cDNA (Clontech社) を鋳型とし、H t r A 2-F1プライマー (5'側にNde I部位とATGを付加、配列番号21) とH t r A 2-RSプライマー (終止コドンを除いてXho I部位を付加、配列番号22) およびDNAポリメラーゼとしてKOD-plus (Toyobo社) を用いてポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR法) により成熟型H t r A 2遺伝子を増幅し、pCR-Blunt II-TOPOベクター (Invitrogen社) にクローニングした。またシーケンサー (Applied Biosystems/Hitachi: ABI 3100) により塩基配列を確認した。本実施例で得られた成熟型H t r A 2 DNA塩基配列および該DNAがコードするアミノ酸配列をそれぞれ配列番号3および4に記載した。成熟型H t r A 2大腸菌発現プラスミドについては、クローニングした成熟型H t r A 2の遺伝子をNde IとXho Iで消化し、pET24bベクター (Novagen社) に組み込むことで得た。

##### 【0052】

成熟型H t r A 2の174番目 [前駆体蛋白質 (配列番号2) では306番目に相当] のセリンをアラニンに置換した変異体は、プロテアーゼの活性が失われることが報告されている。そこで、成熟型H t r A 2発現プラスミドを鋳型とし、H t r A 2-MFプライマー (配列番号23) とH t r A 2-MRプライマー (配列番号24) を用いてQuickChange XL Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene社) により、上記セリンをアラニンに置換した不活性型である成熟型H t r A 2 (S 3 0 6 A) 大腸菌発現プラスミドを作製した。またシーケンサーにより塩基配列を確認した。本実施例で得られた成熟型H t r A 2 (S 3 0 6 A) DNA塩基配列および該DNAがコードするアミノ酸配列をそれぞれ配列番号5および6に記載



した。

#### 【0053】

### 2. 成熟型HtrA2および成熟型HtrA2 (S306A) の発現および精製

成熟型HtrA2大腸菌発現プラスミドを大腸菌BL21 Star (DE3) コンピテントセル (Invitrogen社) に導入した形質転換体を得た。この形質転換体を用いて、26℃の下、100mlのLB培地で培養し、吸光度(OD)が0.68~0.81の時にイソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトピラノシド (IPTG) を最終濃度0.1mM添加することにより成熟型HtrA2蛋白質の発現誘導を行い、一晚培養した後、成熟型HtrA2を発現している大腸菌を遠心処理により分離回収した。得られた大腸菌を、リシスバッファA [Lysis buffer: リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) / 1% トライトンX-100、1μg/ml ペプスタチン、5μM E64] に懸濁し、氷冷下でソニケーター (15秒×10回) により菌体を破碎した。菌体破碎液を遠心処理し (15,000rpm、30分、4℃)、可溶性画分 (上清) と不溶性画分に分離した。成熟型HtrA2の含まれる可溶性画分を、あらかじめ1% トライトンX-100、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて平衡化したプロボンドレジン (Invitrogen社: 1ml prepacked) に加え、4℃で30分間混和した後、洗浄バッファ [20mM リン酸ナトリウム (pH6.0)、500mM NaCl] にて3回洗浄した。レジンに吸着した成熟型HtrA2は、50、100、200、350、500mM イミダゾールをそれぞれ含む溶出バッファ [20mM リン酸ナトリウム (pH6.0)、500mM NaCl] にて段階的に溶出した。各溶出液についてSDS-PAGEを行い、成熟型HtrA2を含む画分を特定した。その結果、350-500mM イミダゾールで成熟型HtrA2が溶出された。成熟型HtrA2を含む画分を150mM NaCl、50mM Tris-HCl (pH7.5) に対して透析した後、遠心処理にて不溶物を除去した上清を濃縮し、牛血清アルブミン (BSA) を標準蛋白質としてクマシープラスプロテインアッセイ (Coomassie Plus Protein Assay, Pierce社) により蛋白質を定量した。また成熟型HtrA2 (S306A) の発現および精製についても同様に行った。

#### 【0054】

### 3. SHC3 (p64)、SHC3 (p52)、CREBL1およびATF6のクローニングおよび発現プラスミドの作製

SHC3 (p64) については、Human Brain QUICK-Clone cDNA (Clontech社) を鋳型とし、SHC3F1プライマー (ATGの直前にBamHI部位とGCCを付加、配列番号25) とSHC3R1プライマー (終止コドンを除いてXhoI部位を付加、配列番号26) およびDNAポリメラーゼとしてKOD-plusを用いてPCR法によりSHC3 (p64) 遺伝子を増幅させ、pCR4Blunt-TOPOベクター (Invitrogen社) にクローニングした。またシーケンサーにより塩基配列を確認した。本実施例で得られたSHC3 (p64) DNA塩基配列は、GenBankにアクセッション番号NM\_016848として既に登録されたDNA塩基配列と比較して6つの塩基に相違が認められた。相違する6塩基のうち、次の4つはゲノム配列と一致することが判明した: T173A (ValからAspへのアミノ酸の変化を伴う); G789A (アミノ酸の変化なし); A811G (ThrからAlaへのアミノ酸の変化を伴う); およびA1661G (GlnからArgへのアミノ酸の変化を伴う)。他の2つの相違する塩基は、G291CおよびA1338Gであり、これらによるアミノ酸の変化はなかった。本実施例で得られたSHC3 DNA塩基配列および該DNAにコードされるアミノ酸配列をそれぞれ配列番号15および16に記載した。SHC3動物細胞発現プラスミドについては、クローニングしたSHC3遺伝子をBamHIとXhoIで消化し、pCMV-Tag5に組み換えることで得た。

#### 【0055】

SHC3のスプライシングバリエーションであるSHC3 (p52) は、SHC遺伝子のコード領域内の2番目のATG (1番目のATGより360base下流) からコードされ

る蛋白質である。SHC3 (p52) については、pCMV-Tag5AにクローニングされているSHC3 (p64) プラスミドをSacIIとXhoIで消化し、SacII-XhoI断片をpCMV-Tag5Aベクターに挿入し、発現プラスミドを構築した。また発現プラスミドにSHC3 (p52) 遺伝子が挿入されていることを制限酵素で消化することで確認した。

#### 【0056】

CREBL1については、まずHuman Brain cDNAを鋳型とし、83-Fプライマー (ATGの直前にEcoRI部位とGCCを付加、配列番号27) と83-Rプライマー (終止コドンを除いてXhoI部位を付加、配列番号28) およびDNAポリメラーゼとしてKOD-plusを用いてPCR法によりCREBL1遺伝子を増幅させ、pCMV-Tag5にクローニングした。

#### 【0057】

次に、pCMV-Tag5に組み込んだCREBL1遺伝子を鋳型とし、ATF6-NF1プライマー (ATGを除いてBamHI部位を付加、配列番号29) とATF6-NR1プライマー (終止コドンの後にXhoI部位を付加、配列番号30) およびDNAポリメラーゼとしてKOD-plusを用いてPCR法によりCREBL1遺伝子を増幅させ、pCR-BluntII-TOPOベクターにクローニングした。またシーケンサーにより塩基配列を確認した。本実施例で得られたCREBL1 DNA塩基配列は、GenBankにアクセッション番号NM\_00438として既に登録されたDNA塩基配列と比較して塩基の1つに相違が認められた (T450C)。この相違によるアミノ酸の変化はなかった。また、終止コドンがTGAからTAAに変化した。これらの相違はPCRエラーではないことを確認した。本実施例で得られたCREBL1 DNA塩基配列および該DNAにコードされるアミノ酸配列をそれぞれ配列番号17および18に記載した。CREBL1動物細胞発現プラスミドについては、クローニングしたCREBL1遺伝子をBamHIとXhoIで消化し、pCMV-Tag3に組み込むことで得た。

#### 【0058】

ATF6については、まず、Mammary Gland QUICK-Clone cDNA (Clontech社) を鋳型とし、ATF6-Fnプライマー (配列番号31) とATF6-Rnプライマー (配列番号32) およびDNAポリメラーゼとしてKOD-plusを用いてPCR法によりATF6遺伝子を増幅させた。次に、この増幅されたATF6遺伝子を鋳型とし、ATF6-F1Lプライマー (ATGの直前にEcoRV siteを付加、配列番号33) とATF6-R1Lプライマー (終止コドンの直後にXhoI siteを付加、配列番号34) およびDNAポリメラーゼとしてKOD-plusを用いてPCR法によりATF6遺伝子をさらに増幅させ、pCR4Blunt-TOPOベクター (Invitrogen社) にクローニングした。またシーケンサーにより塩基配列を確認した (配列番号19)。本実施例で得られたATF6 DNA塩基配列は、GenBankにアクセッション番号NM\_007348として既に登録されたDNA塩基配列と比較して15個の塩基に相違が認められた。相違する15塩基は全てゲノム配列と一致することが判明した: T105C (アミノ酸の変化なし); T199A (LeuからMetへのアミノ酸の変化を伴う); A201G (LeuからMetへのアミノ酸の変化を伴う); C270T (アミノ酸の変化なし); A309G (アミノ酸の変化なし); C433G (ProからAlaへのアミノ酸の変化を伴う); T469C (SerからProへのアミノ酸の変化を伴う); G1228A (GlyからSerへのアミノ酸の変化を伴う); A1230C (GlyからSerへのアミノ酸の変化を伴う); C1389T (アミノ酸の変化なし); T1416C (アミノ酸の変化なし); T1491A (アミノ酸の変化なし); T1538C (ValからAlaへのアミノ酸の変化を伴う); G1540C (ValからLeuへのアミノ酸の変化を伴う); およびG1896A (アミノ酸の変化なし)。また、全てのアミノ酸の変化に関してSWISS-PROTではコンフリクトで記載がある。本実施例で得られたATF6 DNA塩基配列および該DNAにコードされるアミノ酸配列をそれぞれ配列番号19および20に記載した。



## 【0059】

ATF6遺伝子を動物細胞発現ベクターに組み込むために、上記のpCR4Blunt-TOPOベクターにクローニングしたATF6遺伝子を鋳型とし、ATF6F2Lプライマー(ATGの直前にBglII siteを付加、配列番号35)とATF6R1Lプライマー(配列番号34)およびDNAポリメラーゼとしてKOD-plusを用いてPCR法によりATF6遺伝子を増幅し、pCR4Blunt-TOPOベクターにクローニングした。またシーケンサーにより塩基配列を確認した(配列番号19)。このクローニングしたATF6遺伝子をBglIIとXhoIで消化し、BamHIとXhoIで消化した動物細胞発現ベクターであるpCMV-Tag3に組み込んだ。

## 【0060】

## 4. SHC3 (p64)、SHC3 (p52)、CREBL1およびATF6の発現

トランスフェクション前日に細胞数 $1.5 \times 10^6$  / 10 cm ディッシュ(Dish)としたHEK293T細胞に、SHC3 (p64)、SHC3 (p52)、CREBL1、ATF6の各発現プラスミドをFuGene6 (Roche)にて導入した( $10 \mu\text{g}/\text{Dish}$ )。48時間後、細胞をPBSで洗浄し、1mlのリシスバッファーB [ $50 \text{mM}$  Tris-HCl (pH 7.6)、 $150 \text{mM}$  NaCl、1% トライトンX-100、1% ノニデットP-40 (NP-40)、コンプリートミニ (Complete Mini、EDTA不含)]を添加し氷上で10分間静置した。その後、スクレーパーで細胞を集め、1.5mlのチューブに入れ、氷冷下でソニケーション処理(15秒×6回)を行い、氷中で20分静置後、ピペッティングで懸濁し、遠心処理(15,000 rpm、30分間、4℃)により可溶性画分と不溶性画分を分離した。検討用試料としては、可溶性画分を用いた。

## 【0061】

## 5. 成熟型HtrA2および成熟型HtrA2 (S306A)の活性の検討

カゼインザイモグラフィーおよびカゼインナトリウムのプロテアーゼアッセイにより成熟型HtrA2および成熟型HtrA2 (S306A)の活性の検討を行った。カゼインザイモグラフィーはプロトコール (Invitrogen社)に従い、成熟型HtrA2および成熟型HtrA2 (S306A)を非還元下で2×SDS サンプルバッファーと等量混合し、室温で10分静置した後、4~16% ザイモグラム (Blue casein)ゲル (Zymogram Gel、Invitrogen社)による分離を行った。泳動終了後、2.5% トライトンX-100にてリネーチャー (renature)した後、ディベロピングバッファー (Developing buffer)中で37℃、一晩カゼイン分解反応を行った。

## 【0062】

一方、カゼインナトリウムを基質としたプロテアーゼアッセイについては、反応バッファー [ $150 \text{mM}$  NaCl、 $50 \text{mM}$  Tris-HCl (pH 7.5)]中で成熟型HtrA2あるいは成熟型HtrA2 (S306A)を $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、カゼインナトリウムを $400 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度となるように混合し、37℃でインキュベーションした。反応開始3時間後および一晩後に反応液の一部を採取して、2×SDS サンプルバッファーと等量混合し煮沸処理後、SDS-PAGEを行い、クマシーブリリアントブルー (CBB)染色によりカゼインナトリウムの分解の有無を確認した。

## 【0063】

上記検討の結果、成熟型HtrA2によるカゼインの分解が認められたが、成熟型HtrA2 (S306A)ではカゼインの分解が認められなかった。このことから、成熟型HtrA2はプロテアーゼ活性を有する活性型であるが、成熟型HtrA2 (S306A)はプロテアーゼ活性を示さない不活性型であることが確認できた。

## 【0064】

## &lt;方法&gt;

可溶性画分に含まれる夾雑蛋白質の影響を除くために免疫沈降にて樹脂に捕捉したSHC3 (p64)、SHC3 (p52)、CREBL1およびATF6を実験に用いた。S

HC3 (p64)、SHC3 (p52)、CREBL1およびATF6の各可溶性画分300 $\mu$ lを6本のチューブ(No. 1-6)に分注し、各チューブにBSAでブロッキングした50%スラリーのプロテインG セファロース 4 FF (Amersham社)を20 $\mu$ l添加し、4℃で1時間転倒混和後、遠心処理(10,000rpm、10秒間、4℃)にて上清を回収し前処理(pre-clean)を行った。

#### 【0065】

得られた上清に抗Myc抗体(Invitrogen社)を1.7 $\mu$ l(2 $\mu$ g)添加し、4℃で3時間転倒混和後に、BSAでブロッキングしたプロテインG セファロース 4 FFを20 $\mu$ l添加し4℃で1晩転倒混和し、プロテインG セファロース 4 FFにSHC3、CREBL1およびATF6を捕捉した。つぎにSHC3、CREBL1およびATF6が捕捉されたプロテインG セファロース 4 FFを500 $\mu$ lの洗浄バッファー[50mM Tris-HCl(pH7.5)、150mM NaCl、0.01% トライトンX-100]で5回洗浄した後、No. 1および2のチューブには50mM Tris-HCl(pH7.5)、150mM NaCl、0.01% トライトンX-100を、No. 3および4のチューブには50 $\mu$ g/mlの成熟型HtrA2溶液100 $\mu$ lを、No. 5および6のチューブには50 $\mu$ g/mlの成熟型HtrA2(S306A)溶液100 $\mu$ lをそれぞれ加えた。No. 1、3および5のチューブは37℃で4時間、No. 2、4および6のチューブは一晩反応させた後、遠心処理により上清を除去して500 $\mu$ lの洗浄バッファーにて3回、遠心洗浄を行い、2 $\times$ SDS サンプルバッファー( $\beta$ -メルカプトエタノール0.1%含む)を80 $\mu$ l加え煮沸処理した。得られた試料80 $\mu$ lのうち10 $\mu$ lを使用し、SDS-PAGE後、PVDF膜へ転写し、ウエスタンブロットにより、成熟型HtrA2および成熟型HtrA2(S306A)によるSHC3(p64)、SHC3(p52)、CREBL1およびATF6の分解の有無を検出した。1次抗体としては抗c-Myc抗体(9E10)(Santa Cruz社)を、2次抗体はホースラディッシュペーパーオキシダーゼ(HRP)標識した抗マウスIgG抗体(Cell Signaling社)を、検出試薬としてECL Western Blotting Detection System(Amersham社)を用いた。

#### 【0066】

##### <結果>

図1-A、図1-Bおよび図1-Cに示したように、CREBL1、ATF6およびSHC3(p64)はいずれも、成熟型HtrA2によりインビトロで分解された。また、SHC3(p52)も同様に成熟型HtrA2によりインビトロで分解されることを認めた。

#### 【実施例3】

#### 【0067】

(細胞内におけるプロテアーゼアッセイ)

CREBL1、ATF6、SHC3(p64)またはSHC3(p52)とHtrA2の相互作用を細胞内におけるプロテアーゼアッセイにより検討した。

#### 【0068】

##### <材料およびその調製>

成熟型HtrA2のN末の4残基(AVPS)は、アポトーシスの阻害に働くIAP(Inhibitor of apoptosis protein)ファミリー蛋白質との結合モチーフであり、IAPsと結合して阻害することによりカスパーゼ依存的な細胞死を促進すると報告されている。この作用は、細胞内でのプロテアーゼアッセイの検討に影響を与える可能性が考えられる。そこで成熟型HtrA2または成熟型HtrA2(S306A)とIAPsとの相互作用を阻害するために、4残基(AVPS)を欠失させたものまたはアラニンをグリシンに置換(AVPS $\rightarrow$ GVPS)したものを成熟型HtrA2および成熟型HtrA2(S306A)についてそれぞれ作製した。これら各種HtrA2はいずれもC末TagとしてFLAGを付加したものをを用いた。

## 【0069】

## 1. 各種HtrA2の調製

これら成熟型HtrA2の変異体の作製には、成熟型HtrA2を鋳型とし、センスプライマーとしてF1およびF2プライマー（ATGの直前にSacI siteを付加、それぞれ配列番号36および配列番号37）を、アンチセンスプライマーには、HtrA2-RSプライマー（配列番号22）を用い、またDNAポリメラーゼは、Pfu turbo（STRATAGENE）を用いてPCR法により、成熟型HtrA2（ $\Delta$ AVPS）および成熟型HtrA2（GVPS）の各遺伝子を増幅させ、pCR-Blunt II-TOPOベクターにクローニングした。またシークエンサーにより塩基配列を確認した。成熟型HtrA2（ $\Delta$ AVPS）および成熟型HtrA2（GVPS）の動物細胞発現プラスミドについては、クローニングした成熟型HtrA2（ $\Delta$ AVPS）および成熟型HtrA2（GVPS）の各遺伝子をSacIとXhoIで消化し、pCMV-Tag4に組み込むことで得た。本実施例で得られた成熟型HtrA2（ $\Delta$ AVPS）および成熟型HtrA2（GVPS）のDNA塩基配列をそれぞれ配列番号7および9に、該DNAがコードするアミノ酸配列をそれぞれ配列番号8および10に記載した。

## 【0070】

成熟型HtrA2（S306A）の変異体についても同様に、成熟型HtrA2（S306A）を鋳型とし、PCR法により、成熟型HtrA2（S306A、 $\Delta$ AVPS）および成熟型HtrA2（S306A、GVPS）の各遺伝子を増幅させ、pCR-Blunt II-TOPOベクターにクローニングした。成熟型HtrA2（S306A、 $\Delta$ AVPS）および成熟型HtrA2（S306A、GVPS）の動物細胞発現プラスミドについては、クローニングした成熟型HtrA2（S306A、 $\Delta$ AVPS）および成熟型HtrA2（S306A、GVPS）の各遺伝子をSacIとXhoIで消化し、それぞれpCMV-Tag4に組み込むことで得た。本実施例で用いた成熟型HtrA2（S306A、 $\Delta$ AVPS）および成熟型HtrA2（S306A、GVPS）のDNA塩基配列をそれぞれ配列番号11および13に、該DNAがコードするアミノ酸配列をそれぞれ配列番号12および14に記載した。

## 【0071】

## 2. 各種HtrA2の酵素活性の検討

培養細胞で発現した各種HtrA2に関して、カゼインナトリウムを基質としたプロテアーゼアッセイにより、その酵素活性を測定した（実施例2参照）。その結果、成熟型HtrA2（ $\Delta$ AVPS）および成熟型HtrA2（GVPS）はいずれもプロテアーゼ活性を持つ活性型であること、成熟型HtrA2（S306A、 $\Delta$ AVPS）および成熟型HtrA2（S306A、GVPS）はいずれもプロテアーゼ活性を持たない不活性型であることを確認した。

## 【0072】

## 3. SHC3（p64）、SHC3（p52）、CREBL1およびATF6の動物細胞発現ベクターの作製

実施例2と同様の方法で作製したものをを用いた。

## 【0073】

## &lt;方法&gt;

各種HtrA2と各候補蛋白質〔SHC3（p64）、SHC3（p52）、CREBL1およびATF6〕の発現プラスミドは、トランスフェクション前日に細胞数 $5 \times 10^5$  / 6 cm DishとしたHEK293T細胞にFuGene6を用いて導入した。各種HtrA2発現プラスミドは各候補蛋白質発現プラスミドのいずれかと組合わせて、いずれも $1 \mu\text{g}$  / Dish添加した。48時間後、各種HtrA2とSHC3（p64）またはSHC3（p52）とを共発現させた細胞については、 $400 \mu\text{l}$ のリシスバッファーBにより溶解し、遠心処理後、上清に $2 \times \text{SDS}$  サンプルバッファー（ $\beta$ -メルカプトエタノール0.1%含む）を等量加え検討用試料とした。一方、各種HtrA2とCREBL1またはATF6とを共発現させた細胞については、 $200 \mu\text{l}$ のリシスバッファ

ーBに2×SDS・サンプルバッファー(β-メルカプトエタノール0.1%含む)を等量加え、ソニケーション後、煮沸処理したものを検討用試料とした。

【0074】

上記各検討用試料10μlを用いてウエスタンブロットにより、SHC3(p64)、SHC3(p52)、CREBL1およびATF6の発現、および分解の有無を確認した。1次抗体としては抗c-Myc(9E10)抗体を、2次抗体はホースラディッシュペーオキシダーゼ(HRP)標識した抗マウスIgG抗体を、検出試薬としてECL Western Blotting Detection Systemを用いた。

【0075】

<結果>

細胞内におけるCREBL1、ATF6、SHC3(p64)およびSHC3(p52)の分解の有無をそれぞれ図2-A、図2-B、図2-Cおよび図2-Dに示した。CREBL1、ATF6、SHC3(p64)およびSHC3(p52)はいずれも、活性型の成熟型HtrA2(ΔAVPS)または活性型の成熟型HtrA2(GVPS)により分解された。一方、これらは不活性型の成熟型HtrA2(S306A、ΔAVPS)または不活性型の成熟型HtrA2(S306A、GVPS)では分解されなかった。

【実施例4】

【0076】

(HtrA2による分解パターンの検討)

CREBL1、SHC3(p64)またはSHC3(p52)のHtrA2による分解パターンを検討した。検討は、ビオチン化したCREBL1、SHC3(p64)またはSHC3(p52)を用いて、HtrA2によるインビトロ プロテアーゼアッセイにより行った。

【0077】

<材料およびその調製>

1. 成熟型HtrA2および成熟型HtrA2(S306A)

成熟型HtrA2および成熟型HtrA2(S306A)は、実施例2と同様の方法で調製したものをを用いた。

【0078】

2. CREBL1、SHC3(p64)およびSHC3(p52)の各動物細胞発現プラスミド

CREBL1動物細胞発現プラスミドは、pCR-BIuntII-TOPOベクターに実施例2と同様の方法でクローニングしたCREBL1をBamHIとXhoIで消化し、pcDNA3.1/Hisに組み込みことで得た。

SHC3(p64)動物細胞発現プラスミドは、pCR4BIunt-TOPOベクターに実施例2と同様の方法でクローニングしたSHC3(p64)をEcoRIとXhoIで消化し、pcDNA3.1/V5-Hisに組み込むことで得た。

SHC3(p52)動物細胞発現プラスミドは、pCMV-Tag5に実施例2と同様の方法で組み込んだSHC3(p52)をPvuIIとXhoIで消化し、EcoRVとXhoIで消化したpcDNA3.1/V5-Hisにライゲーションして得た。

【0079】

3. インビトロ翻訳反応系を用いたビオチン化CREBL1、SHC3(p64)およびSHC3(p52)の調製

ビオチンで標識されたCREBL1、SHC3(p64)およびSHC3(p52)の調製は、ウサギ網状赤血球ライセート(rabbit reticulocyte lysate)を用いたインビトロ翻訳反応系(TNT登録商標 Transcription/Translation System; Promega社)で行った。

インビトロ翻訳反応溶液(TNT登録商標 Quick Master Mix)40μlに各発現プラスミド(1μg/μl)1.5μl、1mM メチオニン1μl、ビオチン化リジンtRNA(Promega社)1μl、ヌクレアーゼを含まない水(Nuc

lease free water)  $6.5\mu\text{l}$ を加えて全量 $50\mu\text{l}$ とし、 $30^{\circ}\text{C}$ で1.5時間反応させた。その後、反応液 $50\mu\text{l}$ から $12.5\mu\text{l}$ を採取し、 $2\times\text{SDS}$  サンプルバッファーを加え煮沸処理後、ウエスタンブロットにより、ビオチンでラベルされたCREBL1、SHC3 (p64) およびSHC3 (p52) の発現を検出した。検出は、ストレプトアビジン-HRP (Promega社)、Transcend<sup>TM</sup> Chemiluminescent substrate (Transcend<sup>TM</sup> Non-Radioactive Translation detection system; Promega社) を用いて行った。その結果、いずれもビオチン化されていることが確認できた。

#### 【0080】

##### <方法>

上記反応液をプロテアーゼアッセイの試料として用いた。反応液を $12.5\mu\text{l}$ ずつ3本のチューブ (No2-4) に分注し、No2のチューブはコントロールとして、 $50\text{mM}$  Tris-HCl (pH7.5)、 $150\text{mM}$  NaCl、 $0.01\%$  Triton X-100を $25\mu\text{l}$ 、No3のチューブには $200\mu\text{g/ml}$ の成熟型HtrA2溶液を $25\mu\text{l}$ 、No4のチューブには $200\mu\text{g/ml}$ の成熟型HtrA2 (S306A) 溶液 $25\mu\text{l}$ をそれぞれ加え混合した。各チューブ (No2-4) をさらに半量ずつ分注し、1つのチューブは $37^{\circ}\text{C}$ で4時間反応し、もう一方のチューブは、 $37^{\circ}\text{C}$ で一晩反応させた。反応後、各チューブに $2\times\text{SDS}$  サンプルバッファーを加え煮沸処理後、ウエスタンブロットにより、ビオチン化CREBL1、SHC3 (p64)、SHC3 (p52) の分解パターンを検出した。

#### 【0081】

分解の検出は、蛋白質内部のビオチン化されたりジン残基を指標にして、ストレプトアビジン-HRP、Transcend<sup>TM</sup> Chemiluminescent substrateを用いて行った。

#### 【0082】

さらに分解箇所を調べる為、ウエスタンブロットに用いたメンブレンから、ストレプトアビジン-HRPを除去し、各蛋白質に付加されたTagに対する抗体で、ビオチン化CREBL1、SHC3 (p64) およびSHC3 (p52) の分解パターンを検出した。SHC3の検出には、1次抗体として抗V5抗体 (Invitrogen社) を、2次抗体としてHRP標識化抗マウスIgG抗体 (Cell Signaling社) を用いた。CREBL1の検出には、1次抗体として抗Xpress抗体 (Invitrogen社) を、2次抗体としてHRP標識化抗マウスIgG抗体を用いた。分解の検出は、ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham社) を用いて行った。

#### 【0083】

##### <結果>

蛋白質内部のビオチン化されたりジン残基を指標に、成熟型HtrA2によるCREBL1、SHC3 (p64) またはSHC3 (p52) の分解パターンを検討した結果を、それぞれ図3-A、図3-Bおよび図3-Cに示した。また、それぞれの蛋白質のN末端またはC末端に付加されたTagを指標として、CREBL1、SHC3 (p64) およびSHC3 (p52) の分解パターンを検討した結果を、それぞれ図4-A、図4-Bおよび図4-Cに示した。

#### 【0084】

CREBL1については、ビオチン化されたりジン残基を指標にした分解パターンの検討において、 $50\text{kDa}$ 付近に分解産物と思われるバンドが検出された (図3-A)。しかし、抗Tag抗体による分解パターンの検討では、図3-Aで認められた約 $50\text{kDa}$ のフラグメントだけでなく、その他のフラグメントも全く検出できなかった (図4-A)。このことから、CREBL1はHtrA2により数箇所分解されたと考えられる。

#### 【0085】

SHC3 (p64) については、ビオチン化されたりジン残基を指標にした分解パターンの検討において、約70kDa、40kDa、30kDa付近にSHC3 (p64) の分解産物と思われるバンドが検出された(図3-B)。抗Tag抗体による分解パターンの検討においても、同様のバンドが検出された(図4-B)。このことから、SHC3 (p64) は、2箇所以上で成熟型HtrA2により分解された可能性がある。

#### 【0086】

SHC3 (p52) については、ビオチン化されたりジン残基を指標にした分解パターンの検討において、フラグメントが検出できなかった(図3-C)。しかし、抗Tag抗体による分解パターンの検討において、約40kDa付近に分解産物と思われるバンドが検出された(図4-C)。このことから、SHC3 (p52) はHtrA2により数箇所分解されたと考えられる。

#### 【0087】

このように、蛋白質内部を標識化して標識物質を検出することにより、HtrA2による上記蛋白質の分解が検出された。このことから、各蛋白質のN末端またはC末端に付加したTagの検出により明らかになったHtrA2による蛋白質の分解(実施例2および3)は、Tagが切断分離されたことによる見かけ上の分解ではなく、HtrA2が各蛋白質の内部に作用した結果生じた分解であることが判明した。

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0088】

本発明は、SHC3、ATF6またはCREBL1のHtrA2による分解、に基づく神経細胞死の阻害、並びに神経細胞死に基づく疾患、例えば神経変性疾患の防止、治療または改善のために利用可能であり、医薬分野において非常に有用性が高い。さらにHtrA2による細胞死、例えば小胞体ストレスによる細胞死の解明等の研究分野にも利用可能である。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0089】

【図1-A】 活性型HtrA2 (成熟型HtrA2) によりCREBL1がインビトロで分解されたことを説明する図である。不活性型HtrA2 [成熟型HtrA2 (S306A)] ではCREBL1の分解が認められなかった。(実施例2)

【図1-B】 活性型HtrA2 (成熟型HtrA2) によりATF6がインビトロで分解されたことを説明する図である。不活性型HtrA2 [成熟型HtrA2 (S306A)] ではATF6の分解が認められなかった。(実施例2)

【図1-C】 活性型HtrA2 (成熟型HtrA2) によりSHC3 (p64) がインビトロで分解されたことを説明する図である。不活性型HtrA2 [成熟型HtrA2 (S306A)] ではSHC3 (p64) の分解が認められなかった。(実施例2)

【図2-A】 活性型HtrA2 (成熟型HtrA2) のN末4アミノ酸残基を欠失させたHtrA2 ( $\Delta$ AVPS) または活性型HtrA2のN末のアラニンをグリシンに置換したHtrA2 (GVPS) により、CREBL1が細胞内で分解されたことを説明する図である(上図)。不活性型HtrA2 [成熟型HtrA2 (S306A、 $\Delta$ AVPS) または成熟型HtrA2 (S306A、GVPS)] ではCREBL1の分解が認められなかった。下図は細胞内における各HtrA2の発現を示す。(実施例3)

【図2-B】 活性型HtrA2 (成熟型HtrA2) のN末4アミノ酸残基を欠失させたHtrA2 ( $\Delta$ AVPS) または活性型HtrA2のN末のアラニンをグリシンに置換したHtrA2 (GVPS) により、ATF6が細胞内で分解されたことを説明する図である(上図)。不活性型HtrA2 [成熟型HtrA2 (S306A、 $\Delta$ AVPS) または成熟型HtrA2 (S306A、GVPS)] ではATF6の分解が認められなかった。下図は細胞内における各HtrA2の発現を示す。(実施例3)

【図2-C】活性型HtrA2（成熟型HtrA2）のN末4アミノ酸残基を欠失させたHtrA2（ $\Delta$ AVPS）または活性型HtrA2のN末のアラニンをグリシンに置換したHtrA2（GVPS）により、SHC3（p64）が細胞内で分解されたことを説明する図である（上図）。〔成熟型HtrA2（S306A、 $\Delta$ AVPS）または成熟型HtrA2（S306A、GVPS）〕ではSHC3（p64）の分解が認められなかった。下図は細胞内における各HtrA2の発現を示す。（実施例3）

【図2-D】活性型HtrA2（成熟型HtrA2）のN末4アミノ酸残基を欠失させたHtrA2（ $\Delta$ AVPS）または活性型HtrA2のN末のアラニンをグリシンに置換したHtrA2（GVPS）により、SHC3（p52）が細胞内で分解されたことを説明する図である（上図）。〔成熟型HtrA2（S306A、 $\Delta$ AVPS）または成熟型HtrA2（S306A、GVPS）〕ではSHC3（p52）の分解が認められなかった。下図は細胞内における各HtrA2の発現を示す。（実施例3）

【図3-A】蛋白質内部のリジン残基がビオチン化されたCREBL1を用いてビオチンを検出することにより、活性型HtrA2（成熟型HtrA2）によりCREBL1が分解されたことを説明する図である。不活性型HtrA2〔成熟型HtrA2（S306A）〕ではCREBL1の分解が認められなかった。（実施例4）

【図3-B】蛋白質内部のリジン残基がビオチン化されたSHC3（p64）を用いてビオチンを検出することにより、活性型HtrA2（成熟型HtrA2）によりSHC3（p64）が分解されたことを説明する図である。不活性型HtrA2〔成熟型HtrA2（S306A）〕ではSHC3（p64）の分解が認められなかった。（実施例4）

【図3-C】蛋白質内部のリジン残基がビオチン化されたSHC3（p52）を用いてビオチンを検出することにより、成熟型HtrA2によりSHC3（p52）が分解されたことを説明する図である。不活性型HtrA2〔成熟型HtrA2（S306A）〕ではSHC3（p52）の分解が認められなかった。（実施例4）

【図4-A】蛋白質内部のリジン残基がビオチン化されたCREBL1を用いて、CREBL1のN末端に付加されたTagを検出することにより、活性型HtrA2（成熟型HtrA2）によりCREBL1が分解されたことを説明する図である。不活性型HtrA2〔成熟型HtrA2（S306A）〕ではCREBL1の分解が認められなかった。（実施例4）

【図4-B】蛋白質内部のリジン残基がビオチン化されたSHC3（p64）を用いて、SHC3（p64）のC末端に付加されたTagを検出することにより、活性型HtrA2（成熟型HtrA2）によりCREBL1が分解されたことを説明する図である。不活性型HtrA2〔成熟型HtrA2（S306A）〕ではSHC3（p64）の分解が認められなかった。（実施例4）

【図4-C】蛋白質内部のリジン残基がビオチン化されたSHC3（p52）を用いて、SHC3（p52）のC末端に付加されたTagを検出することにより、活性型HtrA2（成熟型HtrA2）によりCREBL1が分解されたことを説明する図である。不活性型HtrA2〔成熟型HtrA2（S306A）〕ではSHC3（p52）の分解が認められなかった。（実施例4）

#### 【配列表フリーテキスト】

【0090】

配列番号5：配列番号3と同じ塩基配列であってその520位の塩基がgである塩基配列からなるポリヌクレオチド。

配列番号6：配列番号4と同じアミノ酸配列であって174番目のアミノ酸残基がAlaに置換したアミノ酸配列からなるポリペプチド。

配列番号7：配列番号3と同じ塩基配列であってその4-15位の塩基を欠失させた塩基配列からなるポリヌクレオチド。



配列番号 8: 配列番号 4 と同じアミノ酸配列であって 2-5 番目のアミノ酸残基を欠失させたアミノ酸配列からなるポリペプチド。

配列番号 9: 配列番号 3 に記載の塩基配列と同じ塩基配列であってその 5 位の塩基が g であるポリヌクレオチド。

配列番号 10: 配列番号 4 と同じアミノ酸配列であって 2 番目のアミノ酸残基が Gly に置換したアミノ酸配列からなるポリペプチド。

配列番号 11: 配列番号 5 と同じ塩基配列であってその 4-15 位の塩基を欠失させた塩基配列からなるポリヌクレオチド。

配列番号 12: 配列番号 6 と同じアミノ酸配列であって 2-5 番目のアミノ酸残基を欠失させたアミノ酸配列からなるポリペプチド。

配列番号 13: 配列番号 5 に記載の塩基配列と同じ塩基配列であってその 5 位の塩基が g であるポリヌクレオチド。

配列番号 14: 配列番号 6 と同じアミノ酸配列であって 2 番目のアミノ酸残基が Gly に置換したアミノ酸配列からなるポリペプチド。

配列番号 21: 配列番号 3 に記載の塩基配列に基づいて設計したプライマー用ポリヌクレオチド。

配列番号 22: 配列番号 3 に記載の塩基配列に基づいて設計したプライマー用ポリヌクレオチド。

配列番号 23: 配列番号 3 に記載の塩基配列に基づいて設計したプライマー用ポリヌクレオチド。

配列番号 24: 配列番号 3 に記載の塩基配列に基づいて設計したプライマー用ポリヌクレオチド。

配列番号 25: 配列番号 15 に記載の塩基配列に基づいて設計したプライマー用ポリヌクレオチド。

配列番号 26: 配列番号 15 に記載の塩基配列に基づいて設計したプライマー用ポリヌクレオチド。

配列番号 27: 配列番号 17 に記載の塩基配列に基づいて設計したプライマー用ポリヌクレオチド。

配列番号 28: 配列番号 17 に記載の塩基配列に基づいて設計したプライマー用ポリヌクレオチド。

配列番号 29: 配列番号 17 に記載の塩基配列に基づいて設計したプライマー用ポリヌクレオチド。

配列番号 30: 配列番号 17 に記載の塩基配列に基づいて設計したプライマー用ポリヌクレオチド。

配列番号 31: 配列番号 19 に記載の塩基配列に基づいて設計したプライマー用ポリヌクレオチド。

配列番号 32: 配列番号 19 に記載の塩基配列に基づいて設計したプライマー用ポリヌクレオチド。

配列番号 33: 配列番号 19 に記載の塩基配列に基づいて設計したプライマー用ポリヌクレオチド。

配列番号 34: 配列番号 19 に記載の塩基配列に基づいて設計したプライマー用ポリヌクレオチド。

配列番号 35: 配列番号 19 に記載の塩基配列に基づいて設計したプライマー用ポリヌクレオチド。

配列番号 36: 配列番号 3 に記載の塩基配列に基づいて設計したプライマー用ポリヌクレオチド。

配列番号 37: 配列番号 3 に記載の塩基配列に基づいて設計したプライマー用ポリヌクレオチド。



## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.  
CELESTAR LEXICO-SCIENCES, INC.

<120> A method for inhibiting apoptosis of nerve cells and for improving neurodegenerative disease by inhibiting degradation of CRBL1, ATF6, or SHC3 caused by HtrA2

<130> NP03-1160

<160> 37

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1377

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```
atggctgcgc cgagggcggg gcggggtgca ggctggagcc ttcgggcatg gcgggctttg      60
gggggcattc gctgggggag gagaccccggt ttgacccttg acctccgggc cctgctgacg      120
tcaggaactt ctgacccccg ggcccagagtg acttatggga ccccagttct ctgggcccgg      180
ttgtctgttg gggtcactga accccgagca tgcctgacgt ctgggacccc ggggtccccgg      240
gcacaactga ctgcggtgac cccagatacc aggaccggg aggccctcaga gaactctgga      300
acccgttcgc gcgcgtggct ggcggtggcg ctgggcgctg ggggggcagt gctgtttgtg      360
ttgtggggcg ggggtcgggg tcctccggcc gtcctcgccg ccgtccctag cccgccgccc      420
gcttctcccc ggagtcagta caacttcacg gcagatgtgg tggagaagac agcacctgcc      480
gtggtctata tcgagatcct ggaccggcac cttttcttgg gccgcgaggt ccctatctcg      540
aacggctcag gattcgtggt ggctgccgat gggctcattg tcaccaacgc ccatgtggtg      600
gctgatcggc gcagagtccg tgtgagactg ctaagcggcg acacgtatga ggccgtggtc      660
acagctgtgg atcccgtggc agacatcgca acgctgagga ttcagactaa ggagcctctc      720
cccacgtgc ctctgggacg ctcagctgat gtccggcaag gggagtttgt tgttgccatg      780
ggaagtcctt ttgcactgca gaacacgata acatccggca ttgttagctc tgctcagcgt      840
```

ccagccagag acctgggact cccccaacc aatgtggaat acattcaaac tgatgcagct 900  
 attgattttg gaaactctgg aggtcccctg gttaacctgg atggggaggt gattggagtg 960  
 aacaccatga aggtcacagc tggaatctcc tttgccatcc cttctgatcg tcttcgagag 1020  
 tttctgcatc gtggggaaaa gaagaattcc tcctccggaa tcagtgggtc ccagcggcgc 1080  
 tacattgggg tgatgatgct gaccctgagt cccagcatcc ttgctgaact acagcttcga 1140  
 gaaccaagct ttcccgatgt tcagcatggt gtactcatcc ataaagtcac cctgggctcc 1200  
 cctgcacacc gggctggtct gcggcctggt gatgtgattt tggccattgg ggagcagatg 1260  
 gtacaaaatg ctgaagatgt ttatgaagct gttcgaaccc aatcccagtt ggcagtgcag 1320  
 atccggcggg gacgagaaac actgacctta tatgtgacct ctgaggtcac agaatga 1377

<210> 2  
 <211> 458  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Ala Pro Arg Ala Gly Arg Gly Ala Gly Trp Ser Leu Arg Ala  
 1 5 10 15

Trp Arg Ala Leu Gly Gly Ile Arg Trp Gly Arg Arg Pro Arg Leu Thr  
 20 25 30

Pro Asp Leu Arg Ala Leu Leu Thr Ser Gly Thr Ser Asp Pro Arg Ala  
 35 40 45

Arg Val Thr Tyr Gly Thr Pro Ser Leu Trp Ala Arg Leu Ser Val Gly  
 50 55 60

Val Thr Glu Pro Arg Ala Cys Leu Thr Ser Gly Thr Pro Gly Pro Arg  
 65 70 75 80

Ala Gln Leu Thr Ala Val Thr Pro Asp Thr Arg Thr Arg Glu Ala Ser  
 85 90 95

Glu Asn Ser Gly Thr Arg Ser Arg Ala Trp Leu Ala Val Ala Leu Gly  
100 105 110

Ala Gly Gly Ala Val Leu Leu Leu Leu Trp Gly Gly Gly Arg Gly Pro  
115 120 125

Pro Ala Val Leu Ala Ala Val Pro Ser Pro Pro Pro Ala Ser Pro Arg  
130 135 140

Ser Gln Tyr Asn Phe Ile Ala Asp Val Val Glu Lys Thr Ala Pro Ala  
145 150 155 160

Val Val Tyr Ile Glu Ile Leu Asp Arg His Pro Phe Leu Gly Arg Glu  
165 170 175

Val Pro Ile Ser Asn Gly Ser Gly Phe Val Val Ala Ala Asp Gly Leu  
180 185 190

Ile Val Thr Asn Ala His Val Val Ala Asp Arg Arg Arg Val Arg Val  
195 200 205

Arg Leu Leu Ser Gly Asp Thr Tyr Glu Ala Val Val Thr Ala Val Asp  
210 215 220

Pro Val Ala Asp Ile Ala Thr Leu Arg Ile Gln Thr Lys Glu Pro Leu  
225 230 235 240

Pro Thr Leu Pro Leu Gly Arg Ser Ala Asp Val Arg Gln Gly Glu Phe  
245 250 255

Val Val Ala Met Gly Ser Pro Phe Ala Leu Gln Asn Thr Ile Thr Ser  
260 265 270

Gly Ile Val Ser Ser Ala Gln Arg Pro Ala Arg Asp Leu Gly Leu Pro  
275 280 285

Gln Thr Asn Val Glu Tyr Ile Gln Thr Asp Ala Ala Ile Asp Phe Gly  
290 295 300

Asn Ser Gly Gly Pro Leu Val Asn Leu Asp Gly Glu Val Ile Gly Val  
305 310 315 320

Asn Thr Met Lys Val Thr Ala Gly Ile Ser Phe Ala Ile Pro Ser Asp  
325 330 335

Arg Leu Arg Glu Phe Leu His Arg Gly Glu Lys Lys Asn Ser Ser Ser  
340 345 350

Gly Ile Ser Gly Ser Gln Arg Arg Tyr Ile Gly Val Met Met Leu Thr  
355 360 365

Leu Ser Pro Ser Ile Leu Ala Glu Leu Gln Leu Arg Glu Pro Ser Phe  
370 375 380

Pro Asp Val Gln His Gly Val Leu Ile His Lys Val Ile Leu Gly Ser  
385 390 395 400

Pro Ala His Arg Ala Gly Leu Arg Pro Gly Asp Val Ile Leu Ala Ile  
405 410 415

Gly Glu Gln Met Val Gln Asn Ala Glu Asp Val Tyr Glu Ala Val Arg  
420 425 430

Thr Gln Ser Gln Leu Ala Val Gln Ile Arg Arg Gly Arg Glu Thr Leu  
435 440 445

Thr Leu Tyr Val Thr Pro Glu Val Thr Glu  
450 455

<210> 3  
<211> 981  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 3  
atggcgcgtcc ctagcccgcc gcccgcttct ccccgagtc agtacaactt catcgagat 60

gtggtggaga agacagcacc tgccgtggtc tatatcgaga tcctggaccg gcaccctttc 120  
ttgggccgag aggtccctat ctcgaacggc tcaggattcg tgggtggctgc cgatgggctc 180  
attgtcacca acgcccattg ggtggctgat cggcgcagag tccgtgtgag actgctaagc 240  
ggcgacacgt atgaggccgt ggtcacagct gtggatcccg tggcagacat cgcaacgctg 300  
aggattcaga ctaaggagcc tctccccacg ctgcctctgg gacgctcagc tgatgtccgg 360  
caaggggagt ttgttgttc catgggaagt ccctttgcac tgcagaacac gatcacatcc 420  
ggcattgtta gctctgtca gcgtccagcc agagacctgg gactccccca aaccaatgtg 480  
gaatacttc aaactgatgc agctattgat tttggaaact ctggaggtcc cctggttaac 540  
ctggatgggg aggtgattgg agtgaacacc atgaaggcca cagctggaat ctcctttgcc 600  
atcccttctg atcgtcttcg agagtctctg catcgtgggg aaaagaagaa ttcctcctcc 660  
ggaatcagtg ggtcccagcg gcgtacatt ggggtgatga tgctgaccct gagtcccagc 720  
atccttgctg aactacagct tcgagaacca agctttcccg atgttcagca tgggtgtactc 780  
atccataaag tcatcctggg ctcccctgca caccgggctg gtctgcggcc tgggtgatgtg 840  
atcttggcca ttggggagca gatggtacaa aatgctgaag atgtttatga agctgttcga 900  
acccaatccc agttggcagt gcagatccgg cggggacgag aaacactgac cttatatgtg 960  
acccctgagg tcacagaatg a 981

<210> 4  
<211> 326  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Val Pro Ser Pro Pro Pro Ala Ser Pro Arg Ser Gln Tyr Asn  
1 5 10 15

Phe Ile Ala Asp Val Val Glu Lys Thr Ala Pro Ala Val Val Tyr Ile  
20 25 30

Glu Ile Leu Asp Arg His Pro Phe Leu Gly Arg Glu Val Pro Ile Ser  
35 40 45

Asn Gly Ser Gly Phe Val Val Ala Ala Asp Gly Leu Ile Val Thr Asn  
50 55 60

Ala His Val Val Ala Asp Arg Arg Arg Val Arg Val Arg Leu Leu Ser  
65 70 75 80

Gly Asp Thr Tyr Glu Ala Val Val Thr Ala Val Asp Pro Val Ala Asp  
85 90 95

Ile Ala Thr Leu Arg Ile Gln Thr Lys Glu Pro Leu Pro Thr Leu Pro  
100 105 110

Leu Gly Arg Ser Ala Asp Val Arg Gln Gly Glu Phe Val Val Ala Met  
115 120 125

Gly Ser Pro Phe Ala Leu Gln Asn Thr Ile Thr Ser Gly Ile Val Ser  
130 135 140

Ser Ala Gln Arg Pro Ala Arg Asp Leu Gly Leu Pro Gln Thr Asn Val  
145 150 155 160

Glu Tyr Ile Gln Thr Asp Ala Ala Ile Asp Phe Gly Asn Ser Gly Gly  
165 170 175

Pro Leu Val Asn Leu Asp Gly Glu Val Ile Gly Val Asn Thr Met Lys  
180 185 190

Val Thr Ala Gly Ile Ser Phe Ala Ile Pro Ser Asp Arg Leu Arg Glu  
195 200 205

Phe Leu His Arg Gly Glu Lys Lys Asn Ser Ser Ser Gly Ile Ser Gly  
210 215 220

Ser Gln Arg Arg Tyr Ile Gly Val Met Met Leu Thr Leu Ser Pro Ser  
225 230 235 240

Ile Leu Ala Glu Leu Gln Leu Arg Glu Pro Ser Phe Pro Asp Val Gln  
245 250 255

His Gly Val Leu Ile His Lys Val Ile Leu Gly Ser Pro Ala His Arg  
260 265 270

Ala Gly Leu Arg Pro Gly Asp Val Ile Leu Ala Ile Gly Glu Gln Met  
275 280 285

Val Gln Asn Ala Glu Asp Val Tyr Glu Ala Val Arg Thr Gln Ser Gln  
290 295 300

Leu Ala Val Gln Ile Arg Arg Gly Arg Glu Thr Leu Thr Leu Tyr Val  
305 310 315 320

Thr Pro Glu Val Thr Glu  
325

<210> 5  
<211> 981  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Polynucleotide consisting of the same base sequence of SEQ ID NO:  
3 wherein the nucleotide of position 520 is g

<400> 5  
atggccgtcc ctagcccgcc gcccgcttct ccccgagtc agtacaactt catcgcagat 60  
gtggtggaga agacagcacc tgccgtggtc tatatcgaga tcctggaccg gcaccctttc 120  
ttgggccgcg aggtccctat ctggaacggc tcaggattcg tgggtggctgc cgatgggctc 180  
attgtcacca acgcccattg ggtggctgat cggcgcagag tccgtgtgag actgctaagc 240  
ggcgacacgt atgaggccgt ggtcacagct gtggatcccg tggcagacat cgcaacgctg 300  
aggattcaga ctaaggagcc tctccccacg ctgcctctgg gacgctcagc tgatgtccgg 360  
caaggggagt ttgttgttgc catgggaagt ccctttgcac tgcagaacac gatcacatcc 420  
ggcattgtta gctctgctca gcgtccagcc agagacctgg gactccccca aaccaatgtg 480

gaatacattc aaactgatgc agctattgat tttggaaacg ctggagggtcc cctgggttaac 540  
 ctggatgggg aggtgattgg agtgaacacc atgaagggtca cagctggaat ctcctttgcc 600  
 atcccttctg atcgtcttcg agagtttctg catcgtgggg aaaagaagaa ttcctcctcc 660  
 ggaatcagtg ggtcccagcg gcgctacatt ggggtgatga tgctgaccct gagtcccagc 720  
 atccttgctg aactacagct tcgagaacca agctttcccg atgttcagca tggtgtactc 780  
 atccataaag tcatcctggg ctcccctgca caccgggctg gtctgcggcc tggtgatgtg 840  
 attttggcca ttggggagca gatggtacaa aatgctgaag atgtttatga agctgttcga 900  
 acccaatccc agttggcagt gcagatccgg cggggacgag aaacactgac cttatatgtg 960  
 acccctgagg tcacagaatg a 981

<210> 6  
 <211> 326  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Polypeptide consisting of the same amino acid sequence of SEQ ID  
 NO:4 wherein the 174th amino acid residue is replaced by Ala

<400> 6

Met Ala Val Pro Ser Pro Pro Pro Ala Ser Pro Arg Ser Gln Tyr Asn  
 1 5 10 15

Phe Ile Ala Asp Val Val Glu Lys Thr Ala Pro Ala Val Val Tyr Ile  
 20 25 30

Glu Ile Leu Asp Arg His Pro Phe Leu Gly Arg Glu Val Pro Ile Ser  
 35 40 45

Asn Gly Ser Gly Phe Val Val Ala Ala Asp Gly Leu Ile Val Thr Asn  
 50 55 60

Ala His Val Val Ala Asp Arg Arg Arg Val Arg Val Arg Leu Leu Ser  
 65 70 75 80



Gly Asp Thr Tyr Glu Ala Val Val Thr Ala Val Asp Pro Val Ala Asp  
85 90 95

Ile Ala Thr Leu Arg Ile Gln Thr Lys Glu Pro Leu Pro Thr Leu Pro  
100 105 110

Leu Gly Arg Ser Ala Asp Val Arg Gln Gly Glu Phe Val Val Ala Met  
115 120 125

Gly Ser Pro Phe Ala Leu Gln Asn Thr Ile Thr Ser Gly Ile Val Ser  
130 135 140

Ser Ala Gln Arg Pro Ala Arg Asp Leu Gly Leu Pro Gln Thr Asn Val  
145 150 155 160

Glu Tyr Ile Gln Thr Asp Ala Ala Ile Asp Phe Gly Asn Ala Gly Gly  
165 170 175

Pro Leu Val Asn Leu Asp Gly Glu Val Ile Gly Val Asn Thr Met Lys  
180 185 190

Val Thr Ala Gly Ile Ser Phe Ala Ile Pro Ser Asp Arg Leu Arg Glu  
195 200 205

Phe Leu His Arg Gly Glu Lys Lys Asn Ser Ser Ser Gly Ile Ser Gly  
210 215 220

Ser Gln Arg Arg Tyr Ile Gly Val Met Met Leu Thr Leu Ser Pro Ser  
225 230 235 240

Ile Leu Ala Glu Leu Gln Leu Arg Glu Pro Ser Phe Pro Asp Val Gln  
245 250 255

His Gly Val Leu Ile His Lys Val Ile Leu Gly Ser Pro Ala His Arg  
260 265 270

Ala Gly Leu Arg Pro Gly Asp Val Ile Leu Ala Ile Gly Glu Gln Met  
275 280 285

Val Gln Asn Ala Glu Asp Val Tyr Glu Ala Val Arg Thr Gln Ser Gln  
290 295 300

Leu Ala Val Gln Ile Arg Arg Gly Arg Glu Thr Leu Thr Leu Tyr Val  
305 310 315 320

Thr Pro Glu Val Thr Glu  
325

<210> 7  
<211> 969  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Polynucleotide consisting of the same base sequence of SEQ ID NO:  
3 wherein the nucleotides of position 4-15 are deleted

<400> 7  
atgccgccgc ccgcttctcc ccggagtcag tacaacttca tcgcagatgt ggtggagaag 60  
acagcacctg ccgtggtcta tatcgagatc ctggaccggc accctttctt gggccgcgag 120  
gtccctatct cgaacggctc aggattcgtg gtggctgccg atgggctcat tgtcaccaac 180  
gcccatgtgg tggctgatcg gcgcagagtc cgtgtgagac tgctaagcgg cgacacgtat 240  
gaggccgtgg tcacagctgt ggatcccgtg gcagacatcg caacgctgag gattcagact 300  
aaggagcctc tccccacgct gcctctggga cgctcagctg atgtccggca aggggagttt 360  
gttgttgcca tgggaagtcc ctttgcactg cagaacacga tcacatccgg cattgttagc 420  
tctgctcagc gtccagccag agacctggga ctcccccaaa ccaatgtgga atacattcaa 480  
actgatgcag ctattgattt tggaaactct ggaggtcccc tggttaacct ggatggggag 540  
gtgattggag tgaacaccat gaaggtcaca gctggaatct cctttgcat cccttctgat 600  
cgtcttcgag agtttctgca tcgtggggaa aagaagaatt cctcctccgg aatcagtggg 660  
tcccagcggc gctacattgg ggtgatgatg ctgaccctga gtcccagcat ccttgctgaa 720  
ctacagcttc gagaaccaag ctttcccgat gttcagcatg gtgtactcat ccataaagtc 780

atcctgggct cccctgcaca ccgggctggt ctgcggcctg gtgatgtgat ttggccatt 840  
 ggggagcaga tggtacaaaa tgctgaagat gtttatgaag ctgttcgaac ccaatcccag 900  
 ttggcagtgc agatccggcg gggacgagaa aactgacct tatatgtgac ccctgaggtc 960  
 acagaatga 969

<210> 8  
 <211> 322  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Polypeptide consisting of the same amino acid sequence of SEQ ID  
 NO:4 wherein the amino acid residues from the 2nd to the 5th are  
 deleted

<400> 8

Met Pro Pro Pro Ala Ser Pro Arg Ser Gln Tyr Asn Phe Ile Ala Asp  
 1 5 10 15

Val Val Glu Lys Thr Ala Pro Ala Val Val Tyr Ile Glu Ile Leu Asp  
 20 25 30

Arg His Pro Phe Leu Gly Arg Glu Val Pro Ile Ser Asn Gly Ser Gly  
 35 40 45

Phe Val Val Ala Ala Asp Gly Leu Ile Val Thr Asn Ala His Val Val  
 50 55 60

Ala Asp Arg Arg Arg Val Arg Val Arg Leu Leu Ser Gly Asp Thr Tyr  
 65 70 75 80

Glu Ala Val Val Thr Ala Val Asp Pro Val Ala Asp Ile Ala Thr Leu  
 85 90 95

Arg Ile Gln Thr Lys Glu Pro Leu Pro Thr Leu Pro Leu Gly Arg Ser  
 100 105 110

Ala Asp Val Arg Gln Gly Glu Phe Val Val Ala Met Gly Ser Pro Phe

115

120

125

Ala Leu Gln Asn Thr Ile Thr Ser Gly Ile Val Ser Ser Ala Gln Arg  
130 135 140

Pro Ala Arg Asp Leu Gly Leu Pro Gln Thr Asn Val Glu Tyr Ile Gln  
145 150 155 160

Thr Asp Ala Ala Ile Asp Phe Gly Asn Ser Gly Gly Pro Leu Val Asn  
165 170 175

Leu Asp Gly Glu Val Ile Gly Val Asn Thr Met Lys Val Thr Ala Gly  
180 185 190

Ile Ser Phe Ala Ile Pro Ser Asp Arg Leu Arg Glu Phe Leu His Arg  
195 200 205

Gly Glu Lys Lys Asn Ser Ser Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gln Arg Arg  
210 215 220

Tyr Ile Gly Val Met Met Leu Thr Leu Ser Pro Ser Ile Leu Ala Glu  
225 230 235 240

Leu Gln Leu Arg Glu Pro Ser Phe Pro Asp Val Gln His Gly Val Leu  
245 250 255

Ile His Lys Val Ile Leu Gly Ser Pro Ala His Arg Ala Gly Leu Arg  
260 265 270

Pro Gly Asp Val Ile Leu Ala Ile Gly Glu Gln Met Val Gln Asn Ala  
275 280 285

Glu Asp Val Tyr Glu Ala Val Arg Thr Gln Ser Gln Leu Ala Val Gln  
290 295 300

Ile Arg Arg Gly Arg Glu Thr Leu Thr Leu Tyr Val Thr Pro Glu Val  
305 310 315 320

Thr Glu

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 981

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> Polynucleotide consisting of the same base sequence of SEQ ID NO:  
3 wherein the nucleotide of position 5 is g

&lt;400&gt; 9

```
atgggctgcc ctagcccgcc gcccgcttct ccccgagtc agtacaactt catcgcat 60
gtggtggaga agacagcacc tgccgtggtc tatatcgaga tcctggaccg gcaccctttc 120
ttgggccgag aggtccctat ctcgaacggc tcaggattcg tgggtggctgc cgatgggctc 180
attgtcacca acgcccattg ggtggctgat cggcgagag tccgtgtgag actgctaagc 240
ggcgacacgt atgaggccgt ggtcacagct gtggatcccg tggcagacat cgcaacgctg 300
aggattcaga ctaaggagcc tctccccacg ctgcctctgg gacgctcagc tgatgtccgg 360
caaggggagt ttgttgtgc catgggaagt ccctttgcac tgcagaacac gatcacatcc 420
ggcattgtta gctctgctca gcgtccagcc agagacctgg gactccccca aaccaatgtg 480
gaatacattc aaactgatgc agctattgat ttgggaaact ctggaggtcc cctgggttaac 540
ctggatgggg aggtgattgg agtgaacacc atgaaggcca cagctggaat ctcctttgcc 600
atcccttctg atcgtcttcg agagtttctg catcgtgggg aaaagaagaa ttcctcctcc 660
ggaatcagtg ggtcccagcg gcgctacatt ggggtgatga tgctgaccct gagtcccagc 720
atccttgctg aactacagct tcgagaacca agctttcccg atgttcagca tgggtgtactc 780
atccataaag tcaccttggg ctcccctgca caccgggctg gtctgcggcc tgggtgatgtg 840
atcttgccca ttgggggagca gatggtacaa aatgctgaag atgtttatga agctgttcga 900
acccaatccc agttggcagt gcagatccgg cggggacgag aaacactgac cttatatgtg 960
accctgagg tcacagaatg a 981
```

<210> 10  
<211> 326  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>

<223> Polypeptide consisting of the same amino acid sequence of SEQ ID NO:4 wherein the 2nd amino acid residue is replace by Gly

<400> 10

Met Gly Val Pro Ser Pro Pro Pro Ala Ser Pro Arg Ser Gln Tyr Asn  
1 5 10 15

Phe Ile Ala Asp Val Val Glu Lys Thr Ala Pro Ala Val Val Tyr Ile  
20 25 30

Glu Ile Leu Asp Arg His Pro Phe Leu Gly Arg Glu Val Pro Ile Ser  
35 40 45

Asn Gly Ser Gly Phe Val Val Ala Ala Asp Gly Leu Ile Val Thr Asn  
50 55 60

Ala His Val Val Ala Asp Arg Arg Arg Val Arg Val Arg Leu Leu Ser  
65 70 75 80

Gly Asp Thr Tyr Glu Ala Val Val Thr Ala Val Asp Pro Val Ala Asp  
85 90 95

Ile Ala Thr Leu Arg Ile Gln Thr Lys Glu Pro Leu Pro Thr Leu Pro  
100 105 110

Leu Gly Arg Ser Ala Asp Val Arg Gln Gly Glu Phe Val Val Ala Met  
115 120 125

Gly Ser Pro Phe Ala Leu Gln Asn Thr Ile Thr Ser Gly Ile Val Ser  
130 135 140

Ser Ala Gln Arg Pro Ala Arg Asp Leu Gly Leu Pro Gln Thr Asn Val  
145 150 155 160

Glu Tyr Ile Gln Thr Asp Ala Ala Ile Asp Phe Gly Asn Ser Gly Gly  
165 170 175

Pro Leu Val Asn Leu Asp Gly Glu Val Ile Gly Val Asn Thr Met Lys  
180 185 190

Val Thr Ala Gly Ile Ser Phe Ala Ile Pro Ser Asp Arg Leu Arg Glu  
195 200 205

Phe Leu His Arg Gly Glu Lys Lys Asn Ser Ser Ser Gly Ile Ser Gly  
210 215 220

Ser Gln Arg Arg Tyr Ile Gly Val Met Met Leu Thr Leu Ser Pro Ser  
225 230 235 240

Ile Leu Ala Glu Leu Gln Leu Arg Glu Pro Ser Phe Pro Asp Val Gln  
245 250 255

His Gly Val Leu Ile His Lys Val Ile Leu Gly Ser Pro Ala His Arg  
260 265 270

Ala Gly Leu Arg Pro Gly Asp Val Ile Leu Ala Ile Gly Glu Gln Met  
275 280 285

Val Gln Asn Ala Glu Asp Val Tyr Glu Ala Val Arg Thr Gln Ser Gln  
290 295 300

Leu Ala Val Gln Ile Arg Arg Gly Arg Glu Thr Leu Thr Leu Tyr Val  
305 310 315 320

Thr Pro Glu Val Thr Glu  
325

<210> 11

<211> 969

<212> DNA

<213> Artificial

&lt;220&gt;

<223> Polynucleotide consisting of the same base sequence of SEQ ID NO:  
5 wherein the nucleotides of position 4-15 are deleted

&lt;400&gt; 11

```
atgccgccgc cgcgttctcc ccggagtcag tacaacttca tcgcagatgt ggtggagaag      60
acagcacctg ccgtggtcta tatcgagatc ctggaccggc accctttctt gggccgcgag      120
gtccctatct cgaacggctc aggattcgtg gtggctgccg atgggctcat tgtcaccaac      180
gccccatgtg tggctgatcg gcgcagagtc cgtgtgagac tgctaagcgg cgacacgtat      240
gaggccgtgg tcacagctgt ggatcccggt gcagacatcg caacgctgag gattcagact      300
aaggagcctc tccccacgct gcctctggga cgctcagctg atgtccggca aggggagitt      360
gttgttgcca tgggaagtcc ctttgactg cagaacacga tcacatccgg cattgttagc      420
tctgctcagc gtccagccag agacctggga ctcccccaaa ccaatgtgga atacattcaa      480
actgatgcag ctattgattt tggaaacgct ggaggtcccc tggttaacct ggatggggag      540
gtgattggag tgaacaccat gaaggtcaca gctggaatct ctttgccat cccttctgat      600
cgtcttcgag agtttctgca tcgtggggaa aagaagaatt cctcctccgg aatcagtggg      660
tcccagcggc gctacattgg ggtgatgatg ctgaccctga gtcccagcat ccttgctgaa      720
ctacagcttc gagaaccaag ctttcccgat gttcagcatg gtgtactcat ccataaagtc      780
atcctgggct cccctgcaca ccgggctggg ctgcggcctg gtgatgtgat ttggccatt      840
ggggagcaga tggtaaaaa tgctgaagat gtttatgaag ctgttcgaac ccaatcccag      900
ttggcagtgc agatccggcg gggacgagaa aactgacct tatatgtgac ccctgaggtc      960
acagaatga                                         969
```

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 322

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> Polypeptide consisting of the same amino acid sequence of SEQ ID  
NO:6 wherein the amino acid residues from the 2nd to the 5th are  
deleted



&lt;400&gt; 12

Met Pro Pro Pro Ala Ser Pro Arg Ser Gln Tyr Asn Phe Ile Ala Asp  
1 5 10 15

Val Val Glu Lys Thr Ala Pro Ala Val Val Tyr Ile Glu Ile Leu Asp  
20 25 30

Arg His Pro Phe Leu Gly Arg Glu Val Pro Ile Ser Asn Gly Ser Gly  
35 40 45

Phe Val Val Ala Ala Asp Gly Leu Ile Val Thr Asn Ala His Val Val  
50 55 60

Ala Asp Arg Arg Arg Val Arg Val Arg Leu Leu Ser Gly Asp Thr Tyr  
65 70 75 80

Glu Ala Val Val Thr Ala Val Asp Pro Val Ala Asp Ile Ala Thr Leu  
85 90 95

Arg Ile Gln Thr Lys Glu Pro Leu Pro Thr Leu Pro Leu Gly Arg Ser  
100 105 110

Ala Asp Val Arg Gln Gly Glu Phe Val Val Ala Met Gly Ser Pro Phe  
115 120 125

Ala Leu Gln Asn Thr Ile Thr Ser Gly Ile Val Ser Ser Ala Gln Arg  
130 135 140

Pro Ala Arg Asp Leu Gly Leu Pro Gln Thr Asn Val Glu Tyr Ile Gln  
145 150 155 160

Thr Asp Ala Ala Ile Asp Phe Gly Asn Ala Gly Gly Pro Leu Val Asn  
165 170 175

Leu Asp Gly Glu Val Ile Gly Val Asn Thr Met Lys Val Thr Ala Gly  
180 185 190

Ile Ser Phe Ala Ile Pro Ser Asp Arg Leu Arg Glu Phe Leu His Arg  
 195 200 205

Gly Glu Lys Lys Asn Ser Ser Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gln Arg Arg  
 210 215 220

Tyr Ile Gly Val Met Met Leu Thr Leu Ser Pro Ser Ile Leu Ala Glu  
 225 230 235 240

Leu Gln Leu Arg Glu Pro Ser Phe Pro Asp Val Gln His Gly Val Leu  
 245 250 255

Ile His Lys Val Ile Leu Gly Ser Pro Ala His Arg Ala Gly Leu Arg  
 260 265 270

Pro Gly Asp Val Ile Leu Ala Ile Gly Glu Gln Met Val Gln Asn Ala  
 275 280 285

Glu Asp Val Tyr Glu Ala Val Arg Thr Gln Ser Gln Leu Ala Val Gln  
 290 295 300

Ile Arg Arg Gly Arg Glu Thr Leu Thr Leu Tyr Val Thr Pro Glu Val  
 305 310 315 320

Thr Glu

<210> 13

<211> 981

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Polynucleotide consisting of the same base sequence of SEQ ID NO:  
 5 wherein the nucleotide of position 5 is g

<400> 13

atgggcgtcc ctagcccgcc gcccgcttct' ccccgagtc agtacaactt catcgcagat 60

gtggtggaga agacagcacc tgccgtggtc tatatcgaga tcctggaccg gcacccttc 120

ttgggccgcg aggtccctat ctggaacggc tcaggattcg tgggtggctgc cgatgggctc 180  
 attgtcacca acgcccattg ggtggctgat cggcgcagag tccgtgtgag actgctaagc 240  
 ggcgacacgt atgaggccgt ggtcacagct gtggatcccg tggcagacat cgcaacgctg 300  
 aggattcaga ctaaggagcc tctccccacg ctgcctctgg gacgctcagc tgatgtccgg 360  
 caaggggagt ttgttgttgc catgggaagt ccctttgcac tgcagaacac gatcacatcc 420  
 ggcatgttta gctctgtca gcgtccagcc agagacctgg gactccccca aaccaatgtg 480  
 gaatacattc aaactgatgc agctattgat tttggaaacg ctggaggtcc cctgggttaac 540  
 ctggatgggg aggtgattgg agtgaacacc atgaaggcca cagctggaat ctcccttgcc 600  
 atcccttctg atcgtcttcg agagtttctg catcgtgggg aaaagaagaa ttcctcctcc 660  
 ggaatcagtg ggtcccagcg gcgctacatt ggggtgatga tgctgaccct gagtcccagc 720  
 atccttgctg aactacagct tcgagaacca agctttcccg atgttcagca tgggtgtactc 780  
 atccataaag tcaccttggg ctcccctgca caccgggctg gtctgcggcc tgggtgatgtg 840  
 attttggcca ttggggagca gatggtacaa aatgctgaag atgtttatga agctgttcga 900  
 acccaatccc agttggcagt gcagatccgg cggggacgag aaacactgac ctatatgtg 960  
 acccctgagg tcacagaatg a 981

<210> 14  
 <211> 326  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Polypeptide consisting of the same amino acid sequence of SEQ ID NO:6 wherein the 2nd amino acid residue is replaced by Gly

<400> 14

Met Gly Val Pro Ser Pro Pro Pro Ala Ser Pro Arg Ser Gln Tyr Asn  
 1 5 10 15

Phe Ile Ala Asp Val Val Glu Lys Thr Ala Pro Ala Val Val Tyr Ile  
 20 25 30

Glu Ile Leu Asp Arg His Pro Phe Leu Gly Arg Glu Val Pro Ile Ser  
35 40 45

Asn Gly Ser Gly Phe Val Val Ala Ala Asp Gly Leu Ile Val Thr Asn  
50 55 60

Ala His Val Val Ala Asp Arg Arg Arg Val Arg Val Arg Leu Leu Ser  
65 70 75 80

Gly Asp Thr Tyr Glu Ala Val Val Thr Ala Val Asp Pro Val Ala Asp  
85 90 95

Ile Ala Thr Leu Arg Ile Gln Thr Lys Glu Pro Leu Pro Thr Leu Pro  
100 105 110

Leu Gly Arg Ser Ala Asp Val Arg Gln Gly Glu Phe Val Val Ala Met  
115 120 125

Gly Ser Pro Phe Ala Leu Gln Asn Thr Ile Thr Ser Gly Ile Val Ser  
130 135 140

Ser Ala Gln Arg Pro Ala Arg Asp Leu Gly Leu Pro Gln Thr Asn Val  
145 150 155 160

Glu Tyr Ile Gln Thr Asp Ala Ala Ile Asp Phe Gly Asn Ala Gly Gly  
165 170 175

Pro Leu Val Asn Leu Asp Gly Glu Val Ile Gly Val Asn Thr Met Lys  
180 185 190

Val Thr Ala Gly Ile Ser Phe Ala Ile Pro Ser Asp Arg Leu Arg Glu  
195 200 205

Phe Leu His Arg Gly Glu Lys Lys Asn Ser Ser Ser Gly Ile Ser Gly  
210 215 220

Ser Gln Arg Arg Tyr Ile Gly Val Met Met Leu Thr Leu Ser Pro Ser  
225 230 235 240

Ile Leu Ala Glu Leu Gln Leu Arg Glu Pro Ser Phe Pro Asp Val Gln  
 245 250 255

His Gly Val Leu Ile His Lys Val Ile Leu Gly Ser Pro Ala His Arg  
 260 265 270

Ala Gly Leu Arg Pro Gly Asp Val Ile Leu Ala Ile Gly Glu Gln Met  
 275 280 285

Val Gln Asn Ala Glu Asp Val Tyr Glu Ala Val Arg Thr Gln Ser Gln  
 290 295 300

Leu Ala Val Gln Ile Arg Arg Gly Arg Glu Thr Leu Thr Leu Tyr Val  
 305 310 315 320

Thr Pro Glu Val Thr Glu  
 325

<210> 15

<211> 1785

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

atgcttccac gcaccaagta taaccgcttc aggaatgact cggtgacatc ggtc gatgac 60

cttctccaca gcctgtcggg gagcggcggc ggaggcaagg tticggcggc gcgcgcgacc 120

ccggcggcgg ctccctactt ggtgtccggc gaggcgctgc gcaaggcgcc cgacgatggg 180

cccggcagcc tgggccacct gctccacaag gtgtcccacc tgaaactctc cagctcgggc 240

ctccgcggcc tgtcgtcggc cgcccgggag cgggcgggcg cgcggtctc gggcagctgc 300

agcgcgcca gcctggccgc cccggacggc agtgcgcct cggcgccccg cgccccggcc 360

atgagcgccg ccaggaagg cggcccggc gacgagccgc tgcccaggcc ccctcggggg 420

gcgccgcacg ccagcgacca ggtgctgggg cccggagtca cctacgtggt caagtacttg 480

gggtgcattg aagttctgcg ctcaatgagg tctcttgact tcagtacaag aacacaaatt 540

accaggggaag ccatcagccg cgtctgtgaa gctgtgcctg gtgcgaaggg agccttcaag 600  
aagagaaagc ctccaagcaa aatgctgtcc agcatcttgg gaaagagcaa cctccagttt 660  
gcgggaatga gcatctctct gaccatctcc acggccagtc tgaacctgcg aactccggac 720  
tccaaacaga tcatagcgaa tcaccacatg cgggtccatct ccttcgcctc tgggggagac 780  
ccggacacaa ctgactatgt tgcataatgt gctaaggacc ctgttaatcg cagagcttgt 840  
cacattttgg aatgctgtga tgggctggcc caggatgtca tcggctccat cggacaagcc 900  
tttgagctcc ggtttaagca atatitacag tgtcctacca agattcccgc tctccatgat 960  
cgaatgcaga gtctggatga gccatggacg gaagaggagg gagatggctc agaccaccca 1020  
tactacaaca gcatcccaag caagatgcct cctccagggg gctttcttga tactagactg 1080  
aaaccagac cccatgctcc tgacacagcc cagttitgcag gaaaagagca gacttattac 1140  
cagggaagac acttaggaga cacttttggc gaagactggc agcaaacc ttttaaggcaa 1200  
gggtcctcgg acatctacag cacgccagaa gggaaactgc acgtggcccc cacgggagaa 1260  
gcaccacct acgtcaacac tcagcagatc ccaccacagg cctggccggc tgcggtcagc 1320  
agtgtgaga gcagcccaag gaaagacctc tttgacatga aaccttttga agatgtcttc 1380  
aagaaccagc ccttggggcc cgtgttaagc aaggcagcct ccgtggagtg catcagccct 1440  
gtgtcaccta gagccccaga tgccaagatg ctggaggaac tgcaagccga gacttggtac 1500  
caaggagaga tgagcaggaa ggaggcagag gggctgtctgg agaaagacgg agacttcctg 1560  
gtcaggaaga gcaccaccaa cccgggctcc tttgtcctca cgggcatgca caatggccag 1620  
gccaaagcacc tgctgtctgt ggaccagaa ggcacgatcc ggacaaagga cagagtcttt 1680  
gacagtatca gccacctcat caaccaccac ctagaaagca gcctgccccat tgtctctgca 1740  
gggagtgage tgtgtctcca gcagccagtg gagaggaagc agtga 1785

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 594

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 16

Met Leu Pro Arg Thr Lys Tyr Asn Arg Phe Arg Asn Asp Ser Val Thr  
1 5 10 15

Ser Val Asp Asp Leu Leu His Ser Leu Ser Val Ser Gly Gly Gly Gly  
20 25 30

Lys Val Ser Ala Ala Arg Ala Thr Pro Ala Ala Ala Pro Tyr Leu Val  
35 40 45

Ser Gly Glu Ala Leu Arg Lys Ala Pro Asp Asp Gly Pro Gly Ser Leu  
50 55 60

Gly His Leu Leu His Lys Val Ser His Leu Lys Leu Ser Ser Ser Gly  
65 70 75 80

Leu Arg Gly Leu Ser Ser Ala Ala Arg Glu Arg Ala Gly Ala Arg Leu  
85 90 95

Ser Gly Ser Cys Ser Ala Pro Ser Leu Ala Ala Pro Asp Gly Ser Ala  
100 105 110

Pro Ser Ala Pro Arg Ala Pro Ala Met Ser Ala Ala Arg Lys Gly Arg  
115 120 125

Pro Gly Asp Glu Pro Leu Pro Arg Pro Pro Arg Gly Ala Pro His Ala  
130 135 140

Ser Asp Gln Val Leu Gly Pro Gly Val Thr Tyr Val Val Lys Tyr Leu  
145 150 155 160

Gly Cys Ile Glu Val Leu Arg Ser Met Arg Ser Leu Asp Phe Ser Thr  
165 170 175

Arg Thr Gln Ile Thr Arg Glu Ala Ile Ser Arg Val Cys Glu Ala Val  
180 185 190

Pro Gly Ala Lys Gly Ala Phe Lys Lys Arg Lys Pro Pro Ser Lys Met  
195 200 205

Leu Ser Ser Ile Leu Gly Lys Ser Asn Leu Gln Phe Ala Gly Met Ser  
210 215 220

Ile Ser Leu Thr Ile Ser Thr Ala Ser Leu Asn Leu Arg Thr Pro Asp  
225 230 235 240

Ser Lys Gln Ile Ile Ala Asn His His Met Arg Ser Ile Ser Phe Ala  
245 250 255

Ser Gly Gly Asp Pro Asp Thr Thr Asp Tyr Val Ala Tyr Val Ala Lys  
260 265 270

Asp Pro Val Asn Arg Arg Ala Cys His Ile Leu Glu Cys Cys Asp Gly  
275 280 285

Leu Ala Gln Asp Val Ile Gly Ser Ile Gly Gln Ala Phe Glu Leu Arg  
290 295 300

Phe Lys Gln Tyr Leu Gln Cys Pro Thr Lys Ile Pro Ala Leu His Asp  
305 310 315 320

Arg Met Gln Ser Leu Asp Glu Pro Trp Thr Glu Glu Glu Gly Asp Gly  
325 330 335

Ser Asp His Pro Tyr Tyr Asn Ser Ile Pro Ser Lys Met Pro Pro Pro  
340 345 350

Gly Gly Phe Leu Asp Thr Arg Leu Lys Pro Arg Pro His Ala Pro Asp  
355 360 365

Thr Ala Gln Phe Ala Gly Lys Glu Gln Thr Tyr Tyr Gln Gly Arg His  
370 375 380

Leu Gly Asp Thr Phe Gly Glu Asp Trp Gln Gln Thr Pro Leu Arg Gln  
385 390 395 400



Gly Ser Ser Asp Ile Tyr Ser Thr Pro Glu Gly Lys Leu His Val Ala  
405 410 415

Pro Thr Gly Glu Ala Pro Thr Tyr Val Asn Thr Gln Gln Ile Pro Pro  
420 425 430

Gln Ala Trp Pro Ala Ala Val Ser Ser Ala Glu Ser Ser Pro Arg Lys  
435 440 445

Asp Leu Phe Asp Met Lys Pro Phe Glu Asp Ala Leu Lys Asn Gln Pro  
450 455 460

Leu Gly Pro Val Leu Ser Lys Ala Ala Ser Val Glu Cys Ile Ser Pro  
465 470 475 480

Val Ser Pro Arg Ala Pro Asp Ala Lys Met Leu Glu Glu Leu Gln Ala  
485 490 495

Glu Thr Trp Tyr Gln Gly Glu Met Ser Arg Lys Glu Ala Glu Gly Leu  
500 505 510

Leu Glu Lys Asp Gly Asp Phe Leu Val Arg Lys Ser Thr Thr Asn Pro  
515 520 525

Gly Ser Phe Val Leu Thr Gly Met His Asn Gly Gln Ala Lys His Leu  
530 535 540

Leu Leu Val Asp Pro Glu Gly Thr Ile Arg Thr Lys Asp Arg Val Phe  
545 550 555 560

Asp Ser Ile Ser His Leu Ile Asn His His Leu Glu Ser Ser Leu Pro  
565 570 575

Ile Val Ser Ala Gly Ser Glu Leu Cys Leu Gln Gln Pro Val Glu Arg  
580 585 590

Lys Gln

<210> 17  
<211> 2112  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 17  
atggcggagc tgatgctgct cagcgagatt gctgaccga cgcgtttctt caccgacaac 60  
ctgcttagcc cggaggactg gggctcgcag aacagcacct tgtattctgg cctagatgaa 120  
gtggccgagg agcagacgca gctcttccgt tgcccggagc aggatgtccc gtttgacggc 180  
agctccctgg acgtggggat ggatgtcagc ccctctgagc ccccatggga actcctgccg 240  
atcttcccag atcttcaggt gaagtctgag ccatcttccc cctgctcttc ctctccctc 300  
agctccgagt catcgcgtct ctccacagag ccatccagcg aggctcttgg gtagggggag 360  
gtgctccatg tgaagacaga gtccttggca ccccaactgt gtctcctggg agatgaccca 420  
acatcctcat ttgaaaccgt ccagatcaat gttatcccca cctctgatga ttcctcagat 480  
gtccagacca agatagaacc tgtctctcca tgttcttccg tcaactctga ggcctccctg 540  
ctctcagccg actcctccag ccaggctttt ataggagagg aggtcctgga agtgaagaca 600  
gagtcctgt ccccttcagg atgcctcctg tgggatgtcc cagccccctc acttgagct 660  
gtccagatca gcatgggccc atcccttgat ggctcctcag gcaaagccct gccacccgg 720  
aagccgccac tgcagcccaa acctgtagtg ctaaccactg tccaatgcc atccagagct 780  
gtgcctccca gcaccacagt ccttctgcag tccctcgtcc agccacccc agtgtccca 840  
gttgtcctca tccagggtgc tattcgagtc cagcctgaag ggccggctcc ctctctacca 900  
cggcctgaga ggaagagcat cggtcccgt cctatgcctg gaaactcctg cccgcctgaa 960  
gtggatgcaa agctgctgaa gcggcagcag cgaatgatca agaaccggga gtcagcctgc 1020  
cagtcgccga gaaagaagaa agagtatctg cagggactgg aggctcggct gcaagcagta 1080  
ctggctgaca accagcagct ccgccgagag aatgctgccc tccggcggcg gctggaggcc 1140  
ctgctggctg aaaacagcga gctcaagta gggctctggaa acaggaaggt ggtctgcatc 1200  
atggctcttc ttctcttcat tgccttcaac tttggacctg tcagcatcag tgagcctcct 1260

tcagctccca tctctcctcg gatgaacaag ggggagcctc aaccccggag acacttgctg 1320  
 gggttctcag agcaagagcc agttcaggga gttgaacctc tccaggggtc ctcccagggc 1380  
 cctaaggagc cccagcccag cccacagac cagcccagtt tcagcaacct gacagccttc 1440  
 cctgggggcg ccaaggagct actactaaga gacctagacc agctcttcct ctctctgat 1500  
 tgccggcact tcaaccgcac tgagtccttg aggcttgctg acgagttgag tggctgggtc 1560  
 cagcgccacc agagaggccg gaggaagatc cctcagaggg cccaggagag acagaagtct 1620  
 cagccacgga agaagtcacc tccagttaag gcagtcccca tccaaccccc tggaccccca 1680  
 gaaagggatt ctgtgggcca gctgcaacta tatcgccacc cagaccgttc gcagccagca 1740  
 ttcttgatg caattgaccg acgggaagac acattttatg ttgtctcttt ccgaaggggac 1800  
 cacctgctgc tcccagccat cagccacaac aagacctccc ggcccaagat gtccctggtg 1860  
 atgcctgcc a tggcccccaa tgagaccctg tcaggccgtg gggccccggg ggactatgag 1920  
 gagatgatgc agatcgagtg tgaggatcatg gacaccaggg tgattcacat caagacctcc 1980  
 acagtgcccc cctcgctccg aaaacagcca tccccaaccc caggcaatgc cacaggtggc 2040  
 cccttgccag tctctgcagc cagccaggcc caccaggcct cccaccagcc cctctacctc 2100  
 aatcatccct aa 2112

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 703

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 18

Met Ala Glu Leu Met Leu Leu Ser Glu Ile Ala Asp Pro Thr Arg Phe  
 1 5 10 15

Phe Thr Asp Asn Leu Leu Ser Pro Glu Asp Trp Gly Leu Gln Asn Ser  
 20 25 30

Thr Leu Tyr Ser Gly Leu Asp Glu Val Ala Glu Glu Gln Thr Gln Leu  
 35 40 45

Phe Arg Cys Pro Glu Gln Asp Val Pro Phe Asp Gly Ser Ser Leu Asp  
50 55 60

Val Gly Met Asp Val Ser Pro Ser Glu Pro Pro Trp Glu Leu Leu Pro  
65 70 75 80

Ile Phe Pro Asp Leu Gln Val Lys Ser Glu Pro Ser Ser Pro Cys Ser  
85 90 95

Ser Ser Ser Leu Ser Ser Glu Ser Ser Arg Leu Ser Thr Glu Pro Ser  
100 105 110

Ser Glu Ala Leu Gly Val Gly Glu Val Leu His Val Lys Thr Glu Ser  
115 120 125

Leu Ala Pro Pro Leu Cys Leu Leu Gly Asp Asp Pro Thr Ser Ser Phe  
130 135 140

Glu Thr Val Gln Ile Asn Val Ile Pro Thr Ser Asp Asp Ser Ser Asp  
145 150 155 160

Val Gln Thr Lys Ile Glu Pro Val Ser Pro Cys Ser Ser Val Asn Ser  
165 170 175

Glu Ala Ser Leu Leu Ser Ala Asp Ser Ser Ser Gln Ala Phe Ile Gly  
180 185 190

Glu Glu Val Leu Glu Val Lys Thr Glu Ser Leu Ser Pro Ser Gly Cys  
195 200 205

Leu Leu Trp Asp Val Pro Ala Pro Ser Leu Gly Ala Val Gln Ile Ser  
210 215 220

Met Gly Pro Ser Leu Asp Gly Ser Ser Gly Lys Ala Leu Pro Thr Arg  
225 230 235 240

Lys Pro Pro Leu Gln Pro Lys Pro Val Val Leu Thr Thr Val Pro Met  
245 250 255

Pro Ser Arg Ala Val Pro Pro Ser Thr Thr Val Leu Leu Gln Ser Leu  
260 265 270

Val Gln Pro Pro Pro Val Ser Pro Val Val Leu Ile Gln Gly Ala Ile  
275 280 285

Arg Val Gln Pro Glu Gly Pro Ala Pro Ser Leu Pro Arg Pro Glu Arg  
290 295 300

Lys Ser Ile Val Pro Ala Pro Met Pro Gly Asn Ser Cys Pro Pro Glu  
305 310 315 320

Val Asp Ala Lys Leu Leu Lys Arg Gln Gln Arg Met Ile Lys Asn Arg  
325 330 335

Glu Ser Ala Cys Gln Ser Arg Arg Lys Lys Lys Glu Tyr Leu Gln Gly  
340 345 350

Leu Glu Ala Arg Leu Gln Ala Val Leu Ala Asp Asn Gln Gln Leu Arg  
355 360 365

Arg Glu Asn Ala Ala Leu Arg Arg Arg Leu Glu Ala Leu Leu Ala Glu  
370 375 380

Asn Ser Glu Leu Lys Leu Gly Ser Gly Asn Arg Lys Val Val Cys Ile  
385 390 395 400

Met Val Phe Leu Leu Phe Ile Ala Phe Asn Phe Gly Pro Val Ser Ile  
405 410 415

Ser Glu Pro Pro Ser Ala Pro Ile Ser Pro Arg Met Asn Lys Gly Glu  
420 425 430

Pro Gln Pro Arg Arg His Leu Leu Gly Phe Ser Glu Gln Glu Pro Val  
435 440 445

Gln Gly Val Glu Pro Leu Gln Gly Ser Ser Gln Gly Pro Lys Glu Pro  
450 455 460

Gln Pro Ser Pro Thr Asp Gln Pro Ser Phe Ser Asn Leu Thr Ala Phe  
465 470 475 480

Pro Gly Gly Ala Lys Glu Leu Leu Leu Arg Asp Leu Asp Gln Leu Phe  
485 490 495

Leu Ser Ser Asp Cys Arg His Phe Asn Arg Thr Glu Ser Leu Arg Leu  
500 505 510

Ala Asp Glu Leu Ser Gly Trp Val Gln Arg His Gln Arg Gly Arg Arg  
515 520 525

Lys Ile Pro Gln Arg Ala Gln Glu Arg Gln Lys Ser Gln Pro Arg Lys  
530 535 540

Lys Ser Pro Pro Val Lys Ala Val Pro Ile Gln Pro Pro Gly Pro Pro  
545 550 555 560

Glu Arg Asp Ser Val Gly Gln Leu Gln Leu Tyr Arg His Pro Asp Arg  
565 570 575

Ser Gln Pro Ala Phe Leu Asp Ala Ile Asp Arg Arg Glu Asp Thr Phe  
580 585 590

Tyr Val Val Ser Phe Arg Arg Asp His Leu Leu Leu Pro Ala Ile Ser  
595 600 605

His Asn Lys Thr Ser Arg Pro Lys Met Ser Leu Val Met Pro Ala Met  
610 615 620

Ala Pro Asn Glu Thr Leu Ser Gly Arg Gly Ala Pro Gly Asp Tyr Glu  
625 630 635 640

Glu Met Met Gln Ile Glu Cys Glu Val Met Asp Thr Arg Val Ile His  
645 650 655

Ile Lys Thr Ser Thr Val Pro Pro Ser Leu Arg Lys Gln Pro Ser Pro  
660 665 670

Thr Pro Gly Asn Ala Thr Gly Gly Pro Leu Pro Val Ser Ala Ala Ser  
675 680 685

Gln Ala His Gln Ala Ser His Gln Pro Leu Tyr Leu Asn His Pro  
690 695 700

<210> 19

<211> 2013

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

```

atgggggagc cggctggggt tgccggcacc atggagtcac ctttagccc gggactcttt      60
cacaggctgg atgaagattg ggattctgct ctctttgctg aactcggta tttcacagac      120
actgatgagc tgcaattgga agcagcaaat gagacgtatg aaaacaattt tgataatctt      180
gattttgatt tggatttgat gccttgggag tcagacattt gggacatcaa caaccaaadc      240
tgtacagtta aagatattaa ggcagaacct cagccacttt ctccagcctc ctcaagttat      300
tcagtctcgt ctctcggtc agtggactct tattcttcaa ctacagcatgt tcctgaggag      360
ttggatttgt ctctagttc tcagatgtct cccctttcct tatatgggtga aaactctaata      420
agtctctctt cagcggagcc actgaaggaa gataagcctg tcacttggtcc taggaacaag      480
actgaaaatg gactgactcc aaagaaaaaa attcaggtga attcaaaacc ttcaattcag      540
ccaagcctt tattgcttcc agcagcacc cagactcaaa caaactccag tgttccagca      600
aaaaccatca ttattcagac agtaccaacg cttatgccat tggcaaagca gcaaccaatt      660
atcagtttac aacctgcacc cactaaaggc cagacgggtt tgctgtctca gcctactgtg      720
gtacaacttc aagcacctgg agttctgccc tctgctcagc cagtccttgc tgttgctggg      780
ggagtcacac agctccctaa tcacgtggtg aatgtggtac cagccccttc agcgaatagc      840
ccagtgaatg gaaaactttc cgtgactaaa cctgtcctac aaagtacat gagaaatgtc      900

```

gggttcagata ttgctgtgct aaggagacag caacgtatga taaaaaatcg agaatccgct 960  
 tgtcagtctc gcaagaagaa gaaagaatat atgctagggt tagaggcgag attaaaggct 1020  
 gccctctcag aaaacgagca actgaagaaa gaaaatggaa cactgaagcg gcagctggat 1080  
 gaagtttgtt cagagaacca gaggcttaaa gtccttagtc caaagcgaag agttgtctgt 1140  
 gtgatgatag tattggcatt tataatactg aactatggac ctatgagcat gttggaacag 1200  
 gattccagga gaatgaacct tagtgtgagc cctgcaaadc aaaggaggca ctttctagga 1260  
 ttttctgcta aagaggcaca ggacacatca gatggtatta tccagaaaaa cagctacaga 1320  
 tatgatcatt ctgtttcaaa tgacaaagcc ctgatgggtc taactgaaga accattgctt 1380  
 tacattcctc cacctccttg tcagccccta attaacacaa cagagtctct caggttaaat 1440  
 catgaacttc gaggatgggt tcatagacat gaagtagaaa ggaccaagtc aagaagaatg 1500  
 acaaataatc aacagaaaac ccgtattctt cagggtgctc tggaacaggg ctcaaattct 1560  
 cagctgatgg ctgttcaata cacagaaacc actagtagta tcagcaggaa ctcagggagt 1620  
 gagctacaag tgtattatgc ttcaccacaga agttatcaag acttttttga agccatccgc 1680  
 agaaggggag acacatttta tgttgtgtca tttcgaaggg atcacctgct gttaccagct 1740  
 accaccata acaagaccac aagacaaaaa atgtcaattg tgttaccagc aataaacata 1800  
 aatgagaatg tgatcaatgg gcaggactac gaagtgatga tgcagattga ctgtcagggt 1860  
 atggacacca ggatcctcca tatcaaaagt tcgtcagttc ctccttacct ccgagatcag 1920  
 cagaggaatc aaaccaacac cttctttggc tcccctcccg cagccacaga ggcaaccac 1980  
 gttgtcagca ccatccctga gtcattacaa tag 2013

<210> 20  
 <211> 670  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 20

Met Gly Glu Pro Ala Gly Val Ala Gly Thr Met Glu Ser Pro Phe Ser  
 1 5 10 15



Pro Gly Leu Phe His Arg Leu Asp Glu Asp Trp Asp Ser Ala Leu Phe  
20 25 30

Ala Glu Leu Gly Tyr Phe Thr Asp Thr Asp Glu Leu Gln Leu Glu Ala  
35 40 45

Ala Asn Glu Thr Tyr Glu Asn Asn Phe Asp Asn Leu Asp Phe Asp Leu  
50 55 60

Asp Leu Met Pro Trp Glu Ser Asp Ile Trp Asp Ile Asn Asn Gln Ile  
65 70 75 80

Cys Thr Val Lys Asp Ile Lys Ala Glu Pro Gln Pro Leu Ser Pro Ala  
85 90 95

Ser Ser Ser Tyr Ser Val Ser Ser Pro Arg Ser Val Asp Ser Tyr Ser  
100 105 110

Ser Thr Gln His Val Pro Glu Glu Leu Asp Leu Ser Ser Ser Ser Gln  
115 120 125

Met Ser Pro Leu Ser Leu Tyr Gly Glu Asn Ser Asn Ser Leu Ser Ser  
130 135 140

Ala Glu Pro Leu Lys Glu Asp Lys Pro Val Thr Gly Pro Arg Asn Lys  
145 150 155 160

Thr Glu Asn Gly Leu Thr Pro Lys Lys Lys Ile Gln Val Asn Ser Lys  
165 170 175

Pro Ser Ile Gln Pro Lys Pro Leu Leu Leu Pro Ala Ala Pro Lys Thr  
180 185 190

Gln Thr Asn Ser Ser Val Pro Ala Lys Thr Ile Ile Ile Gln Thr Val  
195 200 205

Pro Thr Leu Met Pro Leu Ala Lys Gln Gln Pro Ile Ile Ser Leu Gln  
210 215 220

Pro Ala Pro Thr Lys Gly Gln Thr Val Leu Leu Ser Gln Pro Thr Val  
225 230 235 240

Val Gln Leu Gln Ala Pro Gly Val Leu Pro Ser Ala Gln Pro Val Leu  
245 250 255

Ala Val Ala Gly Gly Val Thr Gln Leu Pro Asn His Val Val Asn Val  
260 265 270

Val Pro Ala Pro Ser Ala Asn Ser Pro Val Asn Gly Lys Leu Ser Val  
275 280 285

Thr Lys Pro Val Leu Gln Ser Thr Met Arg Asn Val Gly Ser Asp Ile  
290 295 300

Ala Val Leu Arg Arg Gln Gln Arg Met Ile Lys Asn Arg Glu Ser Ala  
305 310 315 320

Cys Gln Ser Arg Lys Lys Lys Lys Glu Tyr Met Leu Gly Leu Glu Ala  
325 330 335

Arg Leu Lys Ala Ala Leu Ser Glu Asn Glu Gln Leu Lys Lys Glu Asn  
340 345 350

Gly Thr Leu Lys Arg Gln Leu Asp Glu Val Val Ser Glu Asn Gln Arg  
355 360 365

Leu Lys Val Pro Ser Pro Lys Arg Arg Val Val Cys Val Met Ile Val  
370 375 380

Leu Ala Phe Ile Ile Leu Asn Tyr Gly Pro Met Ser Met Leu Glu Gln  
385 390 395 400

Asp Ser Arg Arg Met Asn Pro Ser Val Ser Pro Ala Asn Gln Arg Arg  
405 410 415

His Leu Leu Gly Phe Ser Ala Lys Glu Ala Gln Asp Thr Ser Asp Gly  
420 425 430

Ile Ile Gln Lys Asn Ser Tyr Arg Tyr Asp His Ser Val Ser Asn Asp  
435 440 445

Lys Ala Leu Met Val Leu Thr Glu Glu Pro Leu Leu Tyr Ile Pro Pro  
450 455 460

Pro Pro Cys Gln Pro Leu Ile Asn Thr Thr Glu Ser Leu Arg Leu Asn  
465 470 475 480

His Glu Leu Arg Gly Trp Val His Arg His Glu Val Glu Arg Thr Lys  
485 490 495

Ser Arg Arg Met Thr Asn Asn Gln Gln Lys Thr Arg Ile Leu Gln Gly  
500 505 510

Ala Leu Glu Gln Gly Ser Asn Ser Gln Leu Met Ala Val Gln Tyr Thr  
515 520 525

Glu Thr Thr Ser Ser Ile Ser Arg Asn Ser Gly Ser Glu Leu Gln Val  
530 535 540

Tyr Tyr Ala Ser Pro Arg Ser Tyr Gln Asp Phe Phe Glu Ala Ile Arg  
545 550 555 560

Arg Arg Gly Asp Thr Phe Tyr Val Val Ser Phe Arg Arg Asp His Leu  
565 570 575

Leu Leu Pro Ala Thr Thr His Asn Lys Thr Thr Arg Pro Lys Met Ser  
580 585 590

Ile Val Leu Pro Ala Ile Asn Ile Asn Glu Asn Val Ile Asn Gly Gln  
595 600 605

Asp Tyr Glu Val Met Met Gln Ile Asp Cys Gln Val Met Asp Thr Arg  
610 615 620

Ile Leu His Ile Lys Ser Ser Ser Val Pro Pro Tyr Leu Arg Asp Gln  
625 630 635 640

Gln Arg Asn Gln Thr Asn Thr Phe Phe Gly Ser Pro Pro Ala Ala Thr  
645 650 655

Glu Ala Thr His Val Val Ser Thr Ile Pro Glu Ser Leu Gln  
660 665 670

<210> 21  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of SEQ ID NO:3  
for use as a primer

<400> 21  
catatggccg tccctagccc gccgcccgt tctccc 36

<210> 22  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of SEQ ID NO:3  
for use as a primer

<400> 22  
ctcgagttct gtgacctcag gggtcacata taagg 35

<210> 23  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of SEQ ID NO:3  
for use as a primer

<400> 23

gctattgatt ttggaaacgc tggaggtccc ctggttaacc

40

<210> 24  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of SEQ ID NO:3  
for use as a primer

<400> 24  
ggttaaccag gggacctcca gcgtttccaa aatcaatagc

40

<210> 25  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of SEQ ID NO:1  
5 for use as a primer

<400> 25  
ggatccgccca tgcttccacg caccaagtat aaccgcttc

39

<210> 26  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of SEQ ID NO:1  
5 for use as a primer

<400> 26  
ctcgagctgc ttctctcca ctggctgctg gagacac

37

<210> 27  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of SEQ ID NO:1  
7 for use as a primer

<400> 27  
gcgaattcgc catggcggag ctgatgc 27

<210> 28  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of SEQ ID NO:1  
7 for use as a primer

<400> 28  
gcctcgaggg gatgattgag gtagaggg 28

<210> 29  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of SEQ ID NO:1  
7 for use as a primer

<400> 29  
gcggatcccg cggagctgat gctgctcagc 30

<210> 30  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of SEQ ID NO:1  
7 for use as a primer

<400> 30  
cctcgagggtt tagggatgat tgaggtagag ggg 33

<210> 31  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>

<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of SEQ ID NO:1  
9 for use as a primer

<400> 31  
agttccaggg aaaaggaact tgtgaaatgg 30

<210> 32  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of SEQ ID NO:1  
9 for use as a primer

<400> 32  
acgctcagtt ttccacatag ctgcgggtgc 30

<210> 33  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of SEQ ID NO:1  
9 for use as a primer

<400> 33  
aaagatatca tgggggagcc ggctgggggtt gccggcacc 39

<210> 34  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of SEQ ID NO:1  
9 for use as a primer

<400> 34  
aaactcgagc tattgtaatg actcagggat ggtgctgac 39

<210> 35  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial

&lt;220&gt;

<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of SEQ ID NO:1  
9 for use as a primer

&lt;400&gt; 35

aaaagatcta tgggggagcc ggctgggggtt gccggcacc

39

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of SEQ ID NO:3  
for use as a primer

&lt;400&gt; 36

gagtcacgc cgccgccgc ttctccccgg agtcag

36

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of SEQ ID NO:3  
for use as a primer

&lt;400&gt; 37

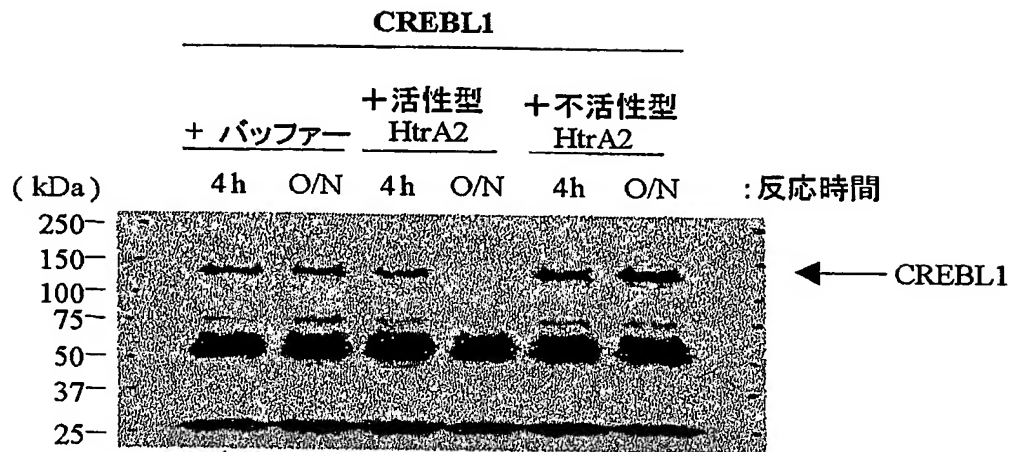
gagtcacgg gcgtccctag cccgccgcc gcttct

36

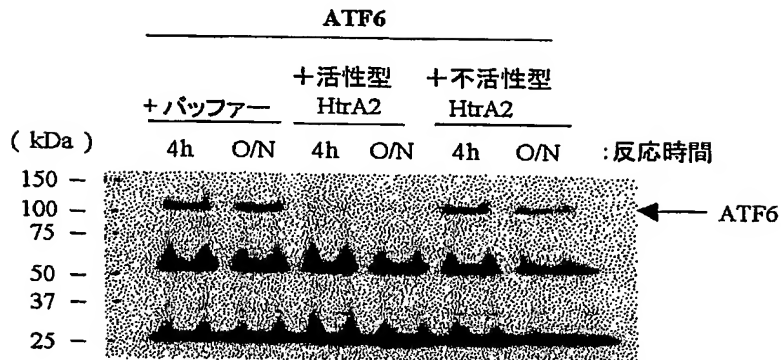


【書類名】図面

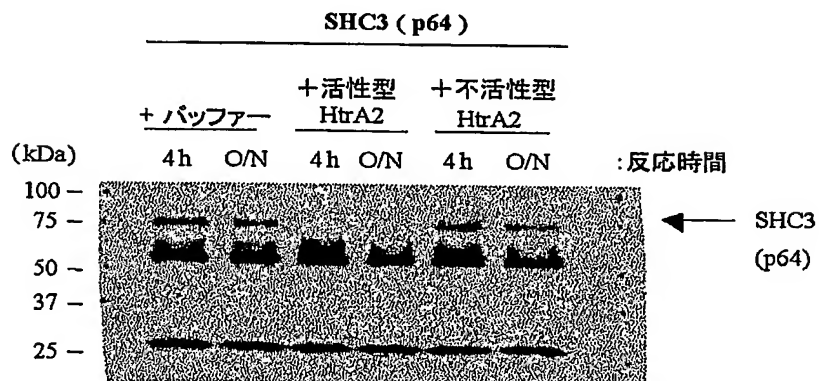
【図 1-A】



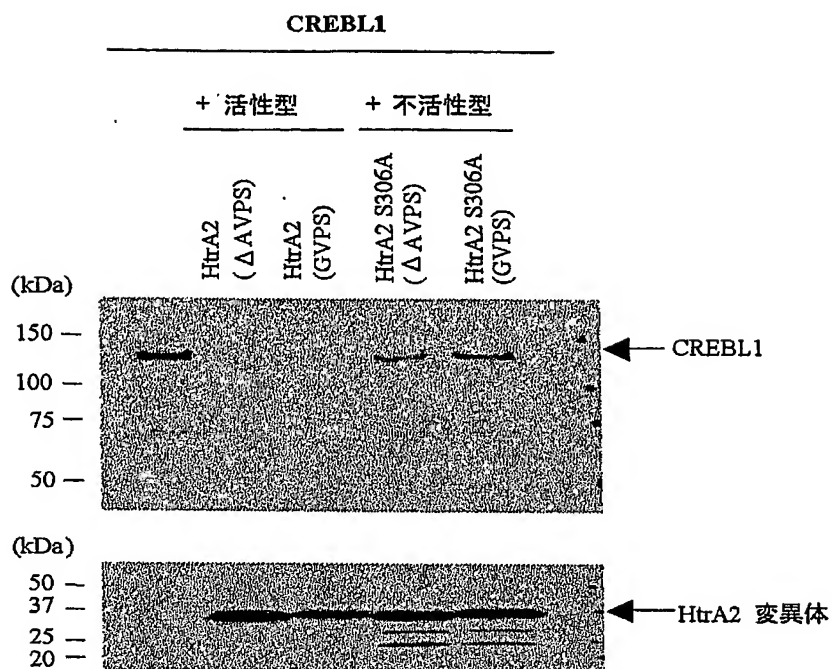
【図 1-B】



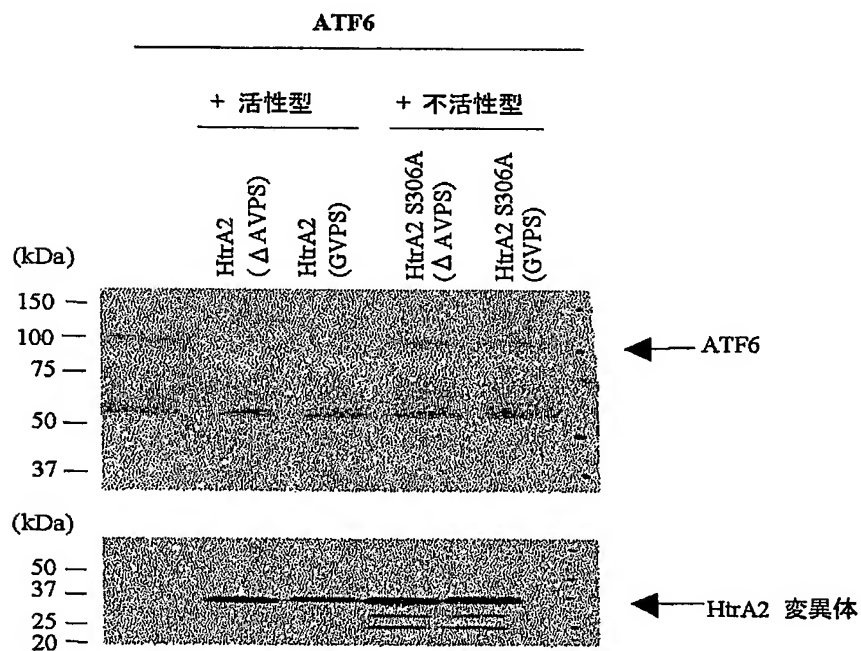
【図 1-C】



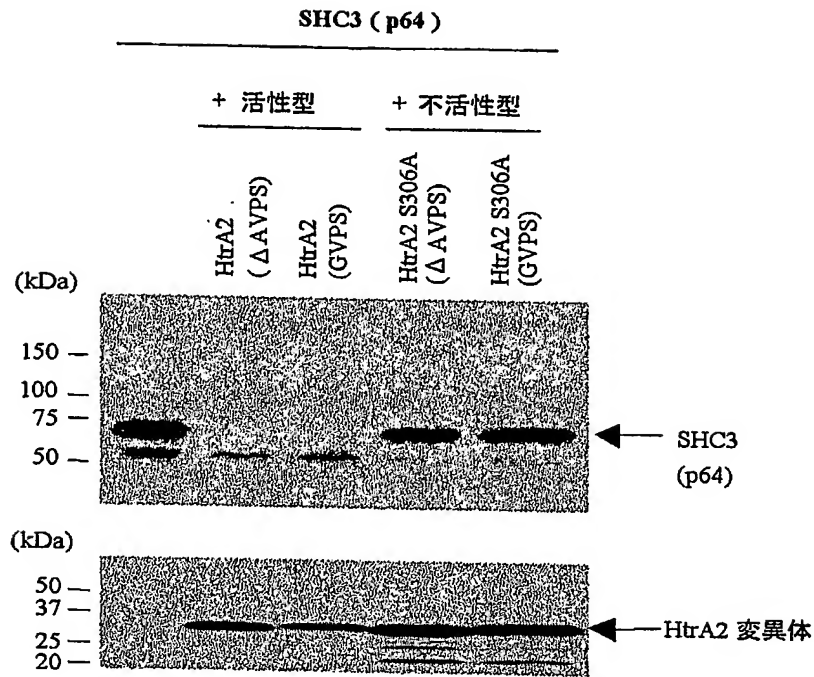
【図 2 - A】



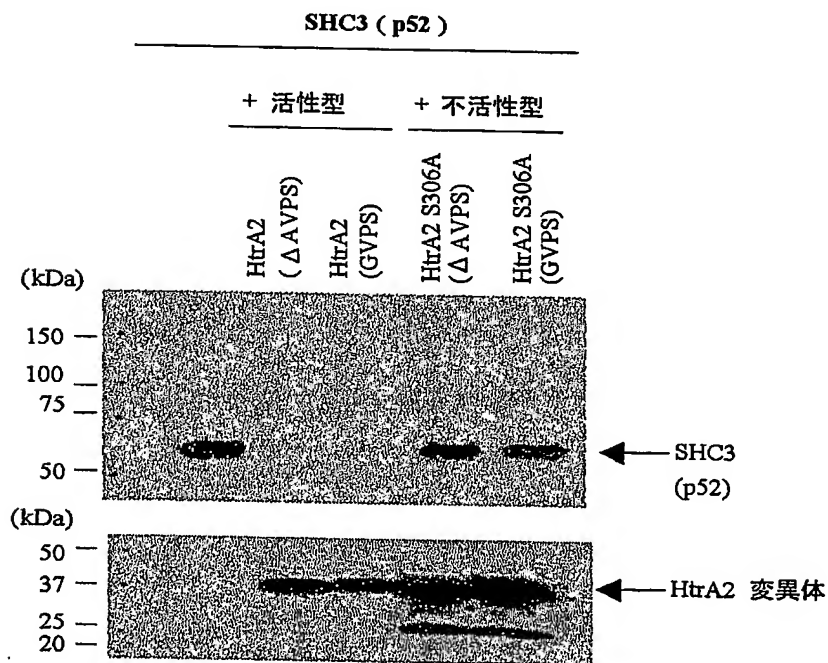
【図 2 - B】



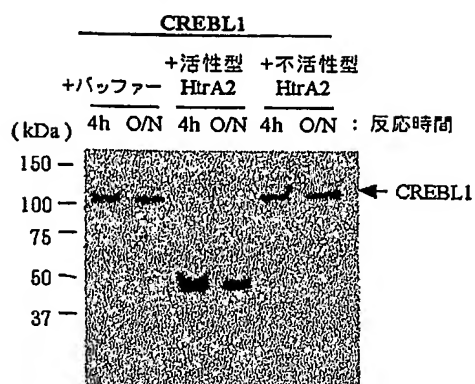
【図 2 - C】



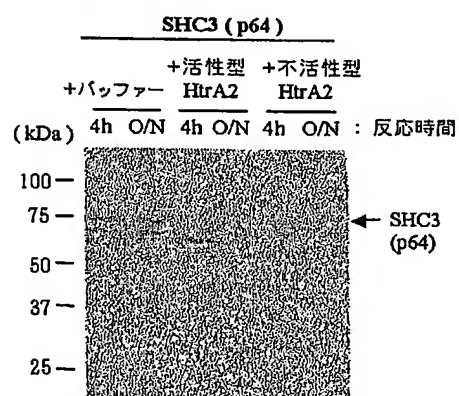
【図 2 - D】



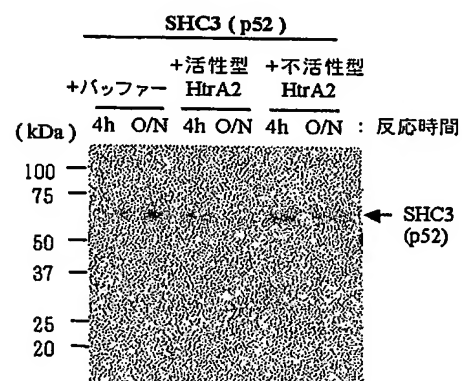
【図 3 - A】



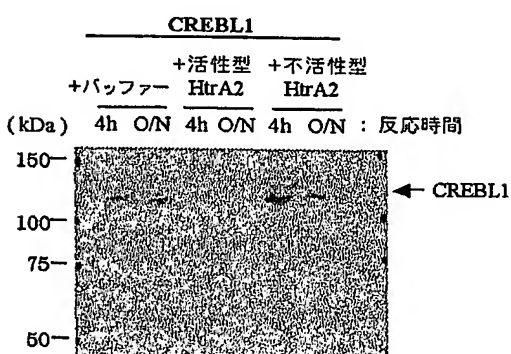
【図 3 - B】



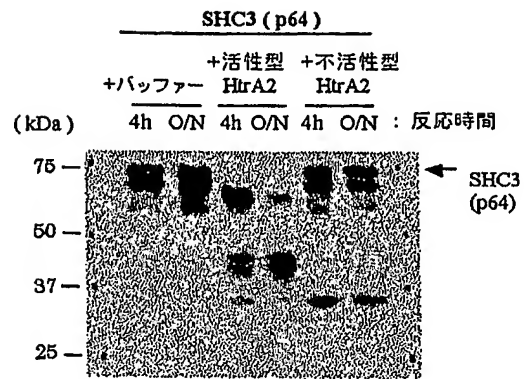
【図 3 - C】



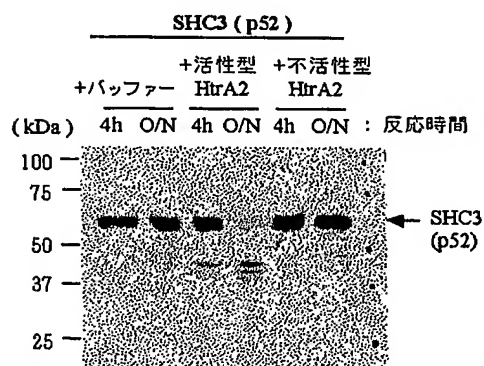
【図 4 - A】



【図 4 - B】



【図 4 - C】



## 【書類名】要約書

## 【要約】

【課題】 H t r A 2 と相互作用する蛋白質を見出し、H t r A 2 による該蛋白質の分解に基づく疾患の防止および／または治療を可能にする手段を提供すること。

【解決手段】 H t r A 2 により C R E B L 1、A T F 6 および S H C 3 が分解されることを見出したことに基づいて、C R E B L 1、A T F 6 および S H C 3 の少なくとも 1 つの分解、より具体的には C R E B L 1、A T F 6 および S H C 3 の少なくとも 1 つの H t r A 2 による分解、を阻害することを特徴とする、神経細胞死の阻害手段、さらには神経細胞死に基づく疾患、例えば神経変性疾患または脳虚血障害の防止、治療または改善のための手段を提供する。

認定・付加情報

|         |                |
|---------|----------------|
| 特許出願の番号 | 特願 2003-342588 |
| 受付番号    | 50301623565    |
| 書類名     | 特許願            |
| 担当官     | 神田 美恵 7397     |
| 作成日     | 平成15年10月 2日    |

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成15年 9月30日

特願 2003-342588

出願人履歴情報

識別番号

[000002831]

1. 変更年月日

1990年 8月28日

[変更理由]

新規登録

住所

東京都中央区日本橋3丁目14番10号

氏名

第一製薬株式会社



特願 2003-342588

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[500520628]

1. 変更年月日

2000年10月26日

[変更理由]

新規登録

住 所

千葉県千葉市美浜区中瀬1丁目3番地 幕張テクノガーデンD

17

氏 名

セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社